

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

AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE DIFERENTES
FRAGMENTOS DA VACINA pCDNA3-hsp65

Claudia Andréa Alves de Araújo

RIBEIRÃO PRETO
2002

CLAUDIA ANDRÉA ALVES DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE DIFERENTES
FRAGMENTOS DA VACINA pCDNA3-hsp65**

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

ORIENTADOR: Dr. Célio Lopes Silva

RIBEIRÃO PRETO

2002

Araújo, Claudia Andréa Alves de
Avaliação da Imunogenicidade de diferentes fragmentos
da vacina pCDNA3-hsp65.

Ribeirão Preto, 2002

164 p. : il; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração:
Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Silva, Célio Lopes

1. Vacina de DNA. 2. Tuberculose

***“Vivendo e aprendendo a jogar
Nem sempre ganhando nem sempre perdendo,
Mas aprendendo a jogar”***

Guilherme Arantes

**Dedico este trabalho a todos os que me fizeram
RESISTIR e PERSISTIR, que me impediram de DESISTIR,
especialmente à ZU, minha MÃE (Pequena Mulher Grande)**

AGRADECIMENTOS:

Ao Dr. Célio Lopes Silva, meu orientador, pela oportunidade de trabalhar com pesquisa aplicada.

A Dra. Sylvia Cardoso Leão, pela colaboração no projeto que originou esta Dissertação, especialmente pela obtenção das novas construções de DNA e determinação dos *motifs* CpG.

Ao Dr. Marcelo Brochi, pelas excelentes sugestões e julgamento deste trabalho, além de ser um exemplo de dedicação à investigação científica e à formação de seus alunos;

A Dra. Luciana Leite, pelas sugestões e julgamento dessa Dissertação.

A Izáira Tincani Brandão, pelo apoio técnico durante a realização deste trabalho.

A Dra. Vânia Bonato, pela colaboração no projeto que originou este trabalho de Dissertação.

A todos os colegas do laboratório, especialmente a Maristela, Andrezza, Sandra, Aline, que eu prezo muito.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada.

Aos colegas da Pós-Graduação, pelo companheirismo.

A Ana Cristine, secretária da Pós-Graduação, pela eficiência, dedicação e disponibilidade em todos os momentos.

A Alexandra Dias, pela análise de dados obtidos por citometria de fluxo.

A FAPESP, pelo apoio financeiro, que permitiu a realização deste trabalho.

ABREVIATURAS:

| | |
|---------------|--|
| Ag85 | Antígenos de 30 kDa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| AIDS | Síndrome da Imunodeficiência Humana |
| APC | Célula Apresentadora de Antígenos |
| CD | Cluster de Diferenciação |
| ConA | Concanavalina A |
| CpG | Citosina pareada com Guanina |
| CR1, CR2, CR3 | Receptor do sistema Complemento 1, 2 e 3 |
| BCG | Bacilo de Calmete-Guérin |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| ELISA | Ensaio Imunoenzimático |
| Fc | Fragmento Cristalizável dos anticorpos |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Humana |
| Hsp65 | Proteína de Choque Térmico 65 kDa de <i>Mycobacterium leprae</i> |
| IFN- γ | Interferon gama |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IgG1 | Imunoglobulina G1 |
| IgG2a | Imunoglobulina G2a |
| IL | Interleucina |
| INOS | Óxido Nítrico Sintase induzível |

| | |
|---------------|---|
| IPTG | Isopropil-tio- β -D-galactosídeo |
| MHC | Complexo Principal de Histocompatibilidade |
| NK | <i>Natural Killer</i> |
| OPD | Orto-fenilenodiamina |
| PBS | Solução Salina Tamponada |
| pCDNA3 | Plasmídeo utilizado como Vetor da vacina |
| pCDNA3-hsp65 | Construção vacinal original, constituída de vetor pCDNA3, gene hsp65 e fragmento <i>downstream</i> |
| pCDNA3-hsp65G | Construção de DNA constituída de vetor pCDNA3 e gene hsp65 |
| pCDNA3-N | Construção de DNA constituída de vetor pCDNA3 e 510 pb da extremidade 5' do inserto da vacina (codificante da extremidade N-terminal da proteína Hsp65) |
| pCDNA3-N59 | Construção de DNA constituída de vetor pCDNA3 e 59 pb da extremidade 5' do inserto da vacina |
| pCDNA3-DS | Construção de DNA constituída de vetor pCDNA3 e fragmento <i>downstream</i> |
| TNF- α | Fator de Necrose Tumoral α |

ÍNDICE

| | | |
|------|---|----|
| I- | INTRODUÇÃO | 1 |
| | 1- TUBERCULOSE | 1 |
| | 1.1- HISTÓRICO | 1 |
| | 1.2- EPIDEMIOLOGIA | 2 |
| | 1.3- PATOGENIA E RESPOSTA IMUNE | 4 |
| | 1.3.1- Papel dos macrófagos | 5 |
| | 1.3.2- Papel dos linfócitos T | 10 |
| | 1.3.3- Papel de células restritas à CD1 | 17 |
| | 2- VACINA BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) | 18 |
| | 3- NOVAS VACINAS CONTRA A TUBERCULOSE | 19 |
| | 4- VACINAS DE DNA | 23 |
| | 4.1- MECANISMO DE AÇÃO | 23 |
| | 4.2- IMUNIDADE CELULAR INDUZIDA PELAS VACINAS DE DNA | 27 |
| | 4.2.1- RESPOSTA DE CÉLULAS T CD4+ | 27 |
| | 4.2.2- RESPOSTA DE CÉLULAS T CD8+ | 28 |
| | 4.2.3- RESPOSTA IMUNE HUMORAL | 28 |
| | 4.2.4- RESPOSTA PROTETORA | 29 |
| | 5- VACINA pCDNA3-hsp65 | 30 |
| II- | JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS | 34 |
| III- | MATERIAL E MÉTODOS | 35 |
| | 1- ANIMAIS | 35 |
| | 2- CLONAGEM DAS NOVAS CONSTRUÇÕES DE DNA A PARTIR DA VACINA pCDNA3-hsp65 | 35 |
| | 3- EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES DE DNA | 37 |
| | 4- PREPARAÇÃO DO DNA PARA IMUNIZAÇÃO | 37 |
| | 4.1- IMUNIZAÇÃO INTRADÉRMICA (GENE GUN) | 37 |

| | |
|---|----|
| 4.2- IMUNIZAÇÃO INTRAMUSCULAR | 48 |
| 5- IMUNIZAÇÃO COM AS CONSTRUÇÕES DE DNA | 39 |
| 5.1- IMUNIZAÇÃO INTRADÉRMICA (GENE GUN) | 39 |
| 5.2- IMUNIZAÇÃO INTRAMUSCULAR | 42 |
| 6- EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Hsp65 RECOMBINANTE | 41 |
| 7- AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DOS ANIMAIS IMUNIZADOS | 42 |
| 7.1- RESPOSTA IMUNE HUMORAL | 42 |
| 7.2- RESPOSTA IMUNE CELULAR | 45 |
| 7.2.1- PROLIFERAÇÃO CELULAR | 46 |
| 7.2.2- DOSAGEM DE CITOCINAS | 47 |
| 7.2.2- AVALIAÇÃO DO INFLUXO DE POPULAÇÕES CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO | 49 |
| 8- DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE MOTIFS CpG PRESENTES NAS CONSTRUÇÕES DE DNA | 51 |
| 8- ANÁLISE ESTATÍSTICA | 49 |
| IV- RESULTADOS | 50 |
| 1- CLONAGEM DAS NOVAS CONSTRUÇÕES DE DNA | 50 |
| 2- EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES DE DNA | 53 |
| 3- EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Hsp65 RECOMBINANTE | 56 |
| 4- AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NOS ANIMAIS IMUNIZADOS | 57 |
| 4.1- RESPOSTA IMUNE HUMORAL | 57 |
| 4.1.1- RESPOSTA IMUNE HUMORAL DOS ANIMAIS IMUNIZADOS POR VIA INTRADÉRMICA (GENE GUN) | 57 |

| | |
|--|-----|
| 4.1.2- RESPOSTA IMUNE HUMORAL DOS ANIMAIS IMUNIZADOS POR VIA INTRAMUSCULAR | 62 |
| 4.2-RESPOSTA IMUNE CELULAR | 67 |
| 4.2.1- PROLIFERAÇÃO CELULAR | 68 |
| A) PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DOS ANIMAIS IMUNIZADOS COM AS CONSTRUÇÕES DE DNA POR VIA INTRADÉRMICA (GENE GUN) | 71 |
| B) PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DOS ANIMAIS IMUNIZADOS COM AS CONSTRUÇÕES DE DNA POR VIA INTRAMUSCULAR | 74 |
| 4.2.2- DOSAGEM DOS NÍVEIS DE CITOCINAS | 74 |
| A) DETECÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS DOS ANIMAIS IMUNIZADOS POR VIA INTRADÉRMICA (GENE GUN) | 74 |
| B) DETECÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS DOS ANIMAIS IMUNIZADOS POR VIA INTRAMUSCULAR | 84 |
| 4.2.3- AVALIAÇÃO DO INFLUXO DE SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS PARA O BAÇO DOS ANIMAIS IMUNIZADOS | 94 |
| A) AVALIAÇÃO DO INFLUXO DE SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS PARA O BAÇO DOS ANIMAIS IMUNIZADOS POR VIA INTRADÉRMICA (GENE GUN) | 94 |
| B) AVALIAÇÃO DO INFLUXO DE SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS PARA O BAÇO DOS ANIMAIS IMUNIZADOS | 102 |
| 5- DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE MOTIFS CpG PRESENTE NAS CONSTRUÇÕES DE DNA | 110 |
| V- DISCUSSÃO | 112 |
| VI- CONCLUSÕES | 125 |
| VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 138 |
| RESUMO | 159 |
| SUMMARY | 162 |

I- INTRODUÇÃO:

1- TUBERCULOSE:

1.1- HISTÓRICO:

A tuberculose é uma enfermidade muito antiga causada por *Mycobacterium tuberculosis*, que foi reconhecida em esqueleto procedentes da Idade da Pedra e em ossos de uma múmia egípcia de 3000 anos de idade (Morse *et al*, 1964) e de lesões pulmonares de uma múmia de 1000 anos de idade no Sudeste do Peru (Salo *et al*, 1994). O nome tuberculose foi usado pela primeira vez por Lanneac e Bayle no início do século XIX (Das, 2000).

Essa enfermidade foi, pela primeira vez, mencionada na literatura Grega usando o termo *phthisis* (quer dizer destruição, consumo, referindo-se ao aspecto destrutivo do tecido pulmonar na tuberculose). Hipócrates reconheceu, em 460-377 a.C., a sintomatologia da tuberculose (Das, 2000), além disso, registrou que a doença era a mais devastadora de todos os tempos e descreveu que, quase sempre, levava os indivíduos doentes a morte (Schmidt, 2000).

Em 1865, Jean-Antoin Villemin, um médico francês, demonstrou a natureza infecciosa da tuberculose, inoculando fluidos provenientes das lesões caseosas pulmonares em animais (Bariety, 1965). Entretanto, o reconhecimento das manifestações clínicas da tuberculose retardaram sua compreensão, até que

Robert Koch identificou, em 1882, o agente causal da tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) (Sakula, 1982).

Até a descoberta dos agentes quimioterápicos no século XX, a tuberculose era considerada incurável. O único tratamento viável era transferir os doentes para hospitais especializados (os sanatórios) onde repousavam, tomavam ar puro e recebiam melhor dieta para ajudar na cura da doença. Entretanto, esse tratamento não era efetivo na maioria dos casos.

No passado, a doença foi disseminada pelos fluxos migratórios ou em decorrência das guerras e da colonização das novas terras descobertas a partir do século XV.

1.2 - EPIDEMIOLOGIA:

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a tuberculose é um flagelo milenar. Atualmente, é considerada uma das maiores causas de mortalidade e morbidade em todo o mundo (WHO, 2000). Dados epidemiológicos indicam que a tuberculose é um problema global, causando 3 milhões de mortes anuais, sendo que 18,5% de todas as mortes ocorre em adultos entre 15-59 anos de idade, a faixa etária mais produtiva da população mundial (Bloom & Murray, 1992; Dolin *et al*, 1994; Raviglione *et al*, 1997; Snider *et al*, 1998). Evidências recentes indicam que essa proporção deva aumentar em 7 a 10 milhões de novos casos em 2015 e a taxa de mortalidade deve aumentar mais que nos anos anteriores (Dye *et al*, 1999). Entre 1850-1950, 1 bilhão de pessoas morreram de tuberculose. Na década de 90, 300 milhões de pessoas foram infectadas, 90

milhões de casos da doença clínica apareceram, e 30 milhões de pessoas morreram, sendo 95% dessa casuística em países em desenvolvimento (Kochi, 1991). Em 1992, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que 4 milhões de pessoas foram co-infectadas com *M. tuberculosis* e o vírus HIV, sendo 95% dos casos em países em desenvolvimento. O impacto dessas duas epidemias nesses países teve grandes implicações médicas e sociais (Narain *et al*, 1992). Em 1996, morreram mais indivíduos de tuberculose que em qualquer outro ano da história. Segundo a OMS, atualmente, cerca de 1/3 (32%) da população mundial está infectada (Dye *et al*, 1999), correspondendo a 2 bilhões de indivíduos infectados, dos quais 10 milhões desenvolvem doença clínica a cada ano (Lopez & Murray, 1998).

O aumento dos casos de tuberculose está associado com fatores de risco importantes, incluindo co-infecção com HIV e o aumento de cepas de *M. tuberculosis* multi-resistentes às drogas (Hingley-Wilson *et al*, 2000), uso de corticóides e outros agentes imunossupressores, enfermidades que suprimem a imunidade celular (incluindo a AIDS), diabetes *mellitus* e silicose. A infecção causada pelo vírus HIV é o maior fator de risco conhecido para a reativação de infecção latente com *M. tuberculosis* (Barnes *et al*, 1991). Indivíduos infectados com HIV são muito susceptíveis a infecção por *M. tuberculosis* e a sinergia entre as duas infecções é a maior causa de morte em áreas endêmicas (Selwyn *et al*, 1989). O surgimento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes às drogas de primeira linha, incluindo izoniazida e rifampicina constitui-se um fator importante na diminuição da eficácia do tratamento da tuberculose e na disseminação de bactérias (Bloom *et al*, 1992). Spencer *et al* (1992) têm relatado que a pobreza e

a aglomeração de pessoas aumenta significativamente o risco de transmissão do bacilo. Pessoas que estão ou estiveram recolhidos em prisões, usuários de drogas, idosos encontram-se em situação de maior risco.

1.3- PATOGENIA E RESPOSTA IMUNE:

A tuberculose é uma infecção que acomete o trato respiratório inferior, sendo, os pulmões, os sítios primários da infecção. Um indivíduo susceptível pode ser infectado com *M. tuberculosis* após a inalação de perdigotos (gotículas respiratórias) produzidos por um indivíduo doente durante a fala, tosse ou espirro (Loudon & Roberts, 1967). Riley (1959) descreveu que menos de 10 bacilos é capaz de promover a infecção. Cada perdigoto mede aproximadamente 1 a 5 μm de diâmetro. As bactérias inaladas prosseguem distalmente em direção aos alvéolos pulmonares para estabelecer a infecção.

M. tuberculosis é capturado pelos macrófagos por fagocitose (Schlesinger *et al*, 1990). Essa captura pode ocorrer através de sua ligação em receptores de superfície dos macrófagos. Esses receptores incluem receptores do complemento (CR1 e CR3), o receptor de manose e receptores Fc (Ernst, 1998; Schlesinger *et al*, 1990; Schlesinger *et al*, 1994).

Schlesinger *et al* (1990) têm descrito que *M. tuberculosis* pode ativar a via alternativa do complemento, resultando na opsonização com C3b e C3bi. Bactérias opsonizadas com C3b e C3bi ligam-se a CR1, CR3 e CR4 e são subseqüentemente fagocitadas pelos macrófagos (Hirsch *et al*, 1994; Schlesinger,

1993; Schlesinger *et al*, 1990). A utilização de receptores presentes nos macrófagos deve ser vantajoso para *M. tuberculosis*, já que a liberação de intermediários reativos do oxigênio não é desencadeada pela captura através de CR3 (Wright *et al*, 1983). Micobactérias patogênicas como *M. tuberculosis*, *M. leprae* e *M. avium*, aumentam a invasão de macrófagos por clivagem de C3 para produzir C3b (Schorey *et al*, 1997).

Receptores de manose (Schlesinger *et al*, 1994), *scavenger* tipo A (Haworth *et al*, 1997), CR3 (Cywes *et al*, 1996) e tipo *toll* 2 (TLR2) (Underhill & Ozinsky, 2002; Underhill *et al*, 1999; Glickman *et al*, 2001) promovem a ligação não opsônica de *M. tuberculosis*.

1.3.1 - Papel dos macrófagos:

Vários autores têm estabelecido as atividades antimicrobianas de macrófagos murinos *in vitro* (Lurie, 1942; Suter, 1952; Mackaness, 1969). Os mecanismos microbicidas dos macrófagos melhor caracterizados são: (1) ação de enzimas lisossomais liberadas nos fagossomos durante a formação do fagolisossomo, (2) produção de intermediários reativos do oxigênio (ROIs) através do *burst* oxidativo, (3) produção de intermediários reativos do nitrogênio (RNIs) e (4) apoptose (revisito por Hingley-Wilson *et al*, 2000; Silva *et al*, 2001).

(1) Formação do fagolisossomo:

Após a ingestão de *M. tuberculosis* através de fagocitose nos macrófagos, ocorre a fusão dos lisossomos com o fagossomos e subsequente morte das

bactérias internalizadas. Contudo, *M. tuberculosis* tem a capacidade de evadir esse mecanismo de morte através da inibição da fusão fagossomo-lisossomo (Russell, 1995; Armstrong, 1971). *M. tuberculosis* sobrevive dentro de vesículas não ácidas em macrófagos humanos (Crowle *et al*, 1991). Essas vesículas contendo *M. tuberculosis* fundem-se com lisossomos que carecem da bomba próton-ATPase para acidificação (Sturgill-Koszycki *et al*, 1994). Gordon *et al* (1980) descreveram que a amônia inibe a fusão fagossomo – lisossomo e *M. tuberculosis* produz amônia para escapar desse efeito.

(2) Produção de intermediários reativos do oxigênio (ROIs) - *burst oxidativo*:

As células fagocíticas destroem a maioria dos patógenos invasores através da ativação da NADPH fagócito oxidase, complexo enzimático que reduz oxigênio molecular para formar ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e outros metabólitos tóxicos para microorganismos invasores. A importância desse sistema é evidenciada em pacientes com doença granulomatosa crônica, que apresentam maior susceptibilidade à infecções bacterianas e fúngicas (Volpp *et al*, 1988).

Cooper *et al* (2000) têm demonstrado que o controle da tuberculose mediada por ROIs é importante no início da infecção. Isso pode ser evidenciado em dois modelos de camundongos transgênicos de doença granulomatosa crônica, que são deficientes de gp91^{phox} e p47^{phox}, componentes importantes do complexo fagossomo oxidase que atuam na atividade e montagem da oxidase funcional, respectivamente (Pollock *et al*, 1995; Jackson *et al*, 1995).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um dos ROIs gerados pelos macrófagos através do *burst* oxidativo, é considerada a primeira molécula capaz de mediar os efeitos micobactericidas dos fagócitos mononucleares (Walker *et al*, 1981). Laochumvorapong *et al* (1997) têm sugerido que *M. tuberculosis* é susceptível à morte por peróxido de hidrogênio *in vitro*. A participação de ROIs na defesa do hospedeiro contra a tuberculose é fundamental antes da ativação dos macrófagos mediada por IFN-gama, produção de óxido nítrico e acidificação do fagossomo.

Alguns mecanismos de escape têm sido desenvolvidos por *M. tuberculosis* para evadir a morte provocada por ROIs, como por exemplo, (1) escape do *burst* oxidativo através da ligação de *M. tuberculosis* aos receptores CR1 e CR3 durante o processo de captura pelos macrófagos (Schlesinger *et al*, 1990); (2) produção de catalase e superóxido dismutase, enzimas capazes de degradar espécies reativas do oxigênio (Middlebrook, 1954; Jackett *et al*, 1978; Andersen *et al*, 1991; Cole *et al*, 1998), (3) utilização da parede celular como barreira protetora para enzimas hidrolíticas e radicais tóxicos do oxigênio, devido à composição rica em lipídeos como lipoarabinomanana (LAM) e sulfatídeos, que sequestram as espécies reativas do oxigênio (Chan *et al*, 1989; McNeil & Brennan, 1991; Brennan *et al*, 1989; Neill & Klebanoff, 1988), diminuindo sua quantidade e toxicidade.

(3) Produção de intermediários reativos do nitrogênio (RNIs):

Além dos ROIs, os intermediários reativos do nitrogênio (RNIs) também desempenham seu papel na defesa do hospedeiro contra tuberculose. RNIs, como o óxido nítrico, são sintetizados a partir da L-arginina através da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Moncada *et al*, 1991). A produção de óxido

nítrico e outros intermediários reativos do nitrogênio através da ação da enzima iNOS é induzida pela ação sinérgica de IFN- γ e TNF- α (Flesch & Kauffman, 1990; Ding *et al*, 1988).

Além disso, a produção simultânea e a interação entre óxido nítrico e ânion superóxido leva à formação de peroxinitrito (ONOO⁻), substância que tem sido demonstrada como potente agente antibacteriano, sendo considerada mais eficiente que óxido nítrico (Ischiropoulos *et al*, 1992).

Camundongos deficientes de iNOS têm a produção de RNIs comprometida e exibem doença crônica quando infectados com *M. tuberculosis* (Schuller-Levis *et al*, 1994). Camundongos infectados com *M. tuberculosis* e tratados com inibidor de iNOS, L-NNMA (N-monometil-L-arginina-mono-acetato) têm maior taxa de mortalidade que camundongos não tratados (Chan *et al*, 1995). Em contrapartida, Gomes *et al* (1999) têm descrito que óxido nítrico exacerba a infecção causada por *M. avium* e camundongos deficientes de iNOS apresenta carga bacteriana, produção de IFN- γ , formação de granuloma diminuídos, indicando que óxido nítrico suprime a resposta imune.

Após o desencadeamento desses mecanismos microbicidas dos macrófagos, se as bactérias sobreviverem e se multiplicarem, elas podem se disseminar e infectar outros macrófagos não ativados. Dentro dos macrófagos alveolares, a multiplicação bacteriana pode prosseguir e se disseminar para os linfonodos regionais do hílio pulmonar (Chackerian *et al*, 2002) e, daí, poderão invadir a corrente sanguínea, espalhando bactérias para todas as partes do corpo.

Os bacilos circulantes são depurados eficientemente da corrente sanguínea, mas a multiplicação bacteriana continua nos ápices dos pulmões e em menor grau nos rins, áreas vascularizadas e linfonodos (Joklik *et al*, 1998). A elevada tensão de oxigênio nos ápices pulmonares proporciona um ambiente favorável para *M. tuberculosis* e isso, provavelmente explica sua predileção por essas áreas.

Os macrófagos ativados limitam a proliferação bacteriana nos focos primários de infecção (áreas dos pulmões). A resposta inflamatória não específica gerada durante a primeira exposição aos bacilos se torna granulomatosa, o que induz a formação dos tubérculos ou granulomas. Kunkel *et al* (1989) define um granuloma como uma coleção de macrófagos, células epitelióides, células gigantes multinucleadas e células epitelióides fundidas, circundada por linfócitos T CD4+ e T CD8+ e delimitada por fibroblastos. Frequentemente, na região central do tubérculo, onde se encontram as células epitelióides, ocorre uma necrose caseosa típica. Mais tardiamente, essas lesões podem calcificar-se, formando o complexo de Ghon (Ulrichs & Kaufmann, 2002).

Em indivíduos com resposta celular deficiente, a infecção primária (tuberculose infecção) evolui para enfermidade clínica (tuberculose doença) (Comstock, 1982). A progressão pode ser local, no sítio da lesão primária, localizado nos pulmões, caracterizando a tuberculose pulmonar; ou ainda, pode ser em outros órgãos, caso tenham sido infectados durante a rápida disseminação hematogênica, caracterizando a tuberculose extrapulmonar.

O granuloma formado nos pulmões apresenta várias funções na defesa do hospedeiro contra tuberculose (revisto por Saunders *et al*, 2000): (1) Formação de um arcabouço celular, onde linfócitos T, produtores de citocinas, e macrófagos

ativados podem se posicionar para ativar outros macrófagos; (2) Circunscrição da área do pulmão infectada, pois o acúmulo de células, o ambiente tóxico rico em espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio, a presença de citocinas, quimiocinas e outras substâncias, que são necessárias para efetuar a resposta imune contra *M. tuberculosis*, podem promover destruição do tecido alveolar; (3) Limitação da disseminação da infecção para outras áreas do pulmão e/ou outros órgãos.

1.3.2 - Papel dos linfócitos T:

Além dos macrófagos, os linfócitos T também apresentam um papel fundamental na resposta contra a tuberculose. Isso se deve ao fato que *M. tuberculosis* se alberga dentro de células, especialmente macrófagos, de modo que os mecanismos efetores mediados por células T são mais eficazes para controlar ou eliminar as bactérias que a resposta de anticorpos.

A participação de linfócitos T na efetuação da resposta imune contra *M. tuberculosis* pode ser comprovada em pacientes que possuem deficiência de resposta celular como pacientes infectados por HIV ou portadores de falência renal crônica, que apresentam maior risco à tuberculose, enquanto que pacientes com mieloma múltiplo, deficiente de resposta humoral, não mostram esse risco aumentado (Hingley-Wilson *et al*, 2000).

A primeira observação, apontando a importância de linfócitos T na tuberculose, foi feita em 1973 por North, quando mostrou que camundongos

timectomizados e irradiados e, posteriormente, reconstituídos com células da medula óssea mostraram-se altamente susceptíveis ao desafio com *M. tuberculosis*. Entretanto, a primeira demonstração direta foi feita por Lefford em 1975, quando demonstrou que a transferência adotiva de células T de camundongos imunizados com BCG protegeu camundongos recipientes irradiados e desafiados com *M. tuberculosis*. Esses achados foram confirmados por Orme e Collins (1983) utilizando células T de camundongos imunes à *M. tuberculosis* Erdman.

A importância da resposta de células T em infecções micobacterianas também foi demonstrada em camundongos *nude* (camundongos que não apresentam células T maduras devido à formação defeituosa do estroma tímico). Esses animais apresentaram o mesmo padrão de susceptibilidade à infecção por *M. avium* que camundongos SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*), que não possuem resposta de células T nem de anticorpos.

(I) Células T CD4+:

Células T CD4+ são algumas das principais células envolvidas na resposta protetora contra tuberculose. *M. tuberculosis* se alberga primariamente em fagossomos dentro dos macrófagos, sendo então seus antígenos processados pela via endossomal, complexados a moléculas de MHC classe II e apresentados à células T CD4+ (Andersen *et al*, 1991; Rook *et al*, 1985).

Observações favorecendo a participação de células T CD4+ na imunidade às infecções micobacterianas foram feitas pela primeira vez por Pedrazzini e Louis (1986) que avaliaram a funcionalidade de células T CD4+ antígeno-específicas de

camundongos imunizados com BCG. Orme (1987) mostrou que células T CD4+ de camundongos infectados com *M. tuberculosis* podem proteger, por transferência adoptiva, camundongos recipientes irradiados e desafiados. A importância de linfócitos T CD4+ na resposta imune contra tuberculose tem sido amplamente observada em pacientes HIV+, cuja diminuição do número de células T CD4+ correlaciona-se com a susceptibilidade à tuberculose (Selwyn *et al*, 1989).

Acredita-se que a função efetora primária de linfócitos T CD4+ é a produção de IFN- γ e outras citocinas, importantes para ativar os macrófagos, que podem controlar ou eliminar as bactérias intracelulares (Nathan *et al*, 1983). IFN- γ é uma citocina crucial para o controle da tuberculose; é produzida por linfócitos T CD4+ e CD8+ e células NK na tuberculose (Lyadova *et al*, 1998; Lalvani *et al*, 1998; Orme *et al*, 1992; Orme *et al*, 1993; Serbina & Flynn, 1999, Barnes *et al*, 1993). Vários estudos indicam que células T CD4+ de memória produzem grandes quantidades de IFN- γ em resposta a *M. tuberculosis* ou BCG (Orme *et al*, 1992; Huygen *et al*, 1992; Kawamura *et al*, 1992). Além disso, camundongos *knock-out* de IFN- γ são mais susceptíveis à infecção por *M. tuberculosis* (Cooper *et al*, 1993; Flynn *et al*, 1993). Ottenhof *et al* (1998) têm descrito que a deficiência individual do gene codificante para IFN- γ ou do receptor de IFN- γ proporcionam aumento da susceptibilidade para infecções micobacterianas.

As células T CD4+ também contribuem para ativação de APCs através da interação CD40L das células T CD4+ com CD40 dos macrófagos ou células dendríticas, resultando no aumento da apresentação de antígeno e da atividade coestimulatória. Essa interação CD40-CD40L parece ser importante na infecção

por *M. tuberculosis*, embora Campos-Neto *et al* (1998) tenham descrito que camundongos deficientes de CD40L-/- são tão susceptíveis à infecção aguda do que camundongos selvagens.

Outra função importante de células T CD4+ é auxiliar na resposta de anticorpos. Apesar de muitos autores descartarem a participação de células B ou de anticorpos na proteção contra a tuberculose (Johnson *et al*, 1997), recentes estudos evidenciam que células B e anticorpos contribuem para a resposta contra tuberculose (Teitelbaum *et al*, 1998; Bosio *et al*, 2000).

Balcewicz-Sablinska *et al* (1998) e Keane *et al* (1997) têm demonstrado que a apoptose ou lise de células infectadas por células T CD4+ também tem função no controle da tuberculose. Apesar de algumas controversas entre vários autores, Oddo *et al* (1998) têm mostrado que ocorre redução do número de bactérias nos macrófagos devido à apoptose induzida por Fas.

Mossman *et al* (1986) descreveram que células T CD4+ ativadas podem se dividir em duas subpopulações típicas de células, baseando-se na produção de citocinas: Células T *helper* 1 (Th1), que produzem IFN- γ , IL-2 e TNF- α , e células T *helper* 2 (Th2), que produzem IL-4, IL-5 e IL-13. Embora vários fatores influenciem a diferenciação de células Th1 e Th2, sugere-se que a presença de citocinas no início da ativação das células T CD4+ parece ser mais importante (O'Garra, 1998; Seder & Paul, 1994; Mossman *et al*, 1986). A presença de IL-12 facilita a diferenciação para o fenótipo Th1 enquanto a presença de IL-4 facilita a diferenciação para o fenótipo Th2. O controle da tuberculose é mediado por resposta Th1. Na tuberculose, IL-12 é induzida após a fagocitose de *M.*

tuberculosis por macrófagos e células dendríticas (Ladel *et al*, 1997; Henderson *et al*, 1997). A administração de IL-12 no início da infecção de camundongos BALB/c com *M. tuberculosis* resulta na diminuição significativa da carga bacteriana e aumento da taxa de sobrevivência, embora os camundongos ainda sucumbam à infecção (Flynn *et al*, 1995).

(II) Células T CD8+:

Apesar de, historicamente, a investigação da participação de células T na resposta contra tuberculose tenha sido enfocada no estudo de células T CD4+, nos últimos anos tem aumentado o interesse no conhecimento das funções de células T CD8+ na tuberculose.

Vários autores têm descrito que células T CD8+ influenciam o controle da infecção. Tem sido demonstrado que camundongos deficientes dos genes codificantes da β 2-microglobulina ou TAP, (deficientes de moléculas de MHC classe I) (Behar *et al*, 1999) e de células T CD8+ são altamente susceptíveis a infecção por *M. tuberculosis* (Sousa *et al*, 1999; Flynn *et al*, 1992). Nas infecções micobacterianas, as células T CD8+ podem ser restritas a moléculas de classe I clássicas ou não clássicas. Vários autores têm descrito que células T CD8+ restritas a MHC classe I provenientes de camundongos ou indivíduos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* ou imunizados com BCG, reconhecem vários antígenos, incluindo antígeno 38 kDa (Zhu *et al*, 1997), Hsp65 (Silva *et al*, 2000) e lipoproteína 19 kDa (Mohagheghpour *et al*, 1998).

Os mecanismos pelos quais proteínas micobacterianas são processadas e apresentadas no contexto de MHC de classe I ainda não estão completamente entendidos. McDonough *et al* (1993) têm demonstrado que *M. tuberculosis* pode ser encontrada fora das vesículas fagossomais 4 a 5 dias após a infecção, mas a apresentação de antígenos micobacterianos por macrófagos infectados à células T CD8+ pode ocorrer em torno de 12 horas após a infecção. Existem evidências que *M. tuberculosis* é capaz de formar poros na membrana das vesículas que albergam os bacilos. Esses poros permitem a entrada dos antígenos micobacterianos no citoplasma da célula. Mazzaccaro *et al* (1996) têm descrito que macrófagos infectados por *M. tuberculosis* facilitam a apresentação via MHC classe I de ovalbumina solúvel, indicando que a ovalbumina é capturada juntamente com *M. tuberculosis* nos fagossomos e depois, penetram no citoplasma da célula. Entretanto, se *M. tuberculosis* estiver morta ou fixada não ocorre a apresentação de ovalbumina, sugerindo que *M. tuberculosis* viva promove formação de poros no fagossomo.

Desse modo, vários antígenos micobacterianos são secretados para o citoplasma e assim, podem ser processados e apresentados via MHC classe I. Outra evidência importante tem sido proposta por Canaday *et al* (1999), que demonstraram pela primeira vez que monócitos humanos podem processar antígenos de *M. tuberculosis* através de uma via de processamento alternativa, diferente de MHC classe I, e apresentar à células T CD8+, pois o processamento e apresentação de *M. tuberculosis*, pelos monócitos, à células T CD8+ restritas a MHC classe I foi insensível ao tratamento com brefeldin A, substância que bloqueia a apresentação convencional via MHC classe I.

Moléculas de MHC classe Ib também apresentam antígenos micobacterianos a células T CD8+. Clones de células T CD8+ isolados de doadores reativos ao PPD reconhecem células dendríticas infectadas com *M. tuberculosis* e produzem IFN-gama, contudo não foram restritas à moléculas de MHC classe I nem MHC classe II nem moléculas CD1 (Lewinsohn *et al*, 1998). Em murinos, moléculas de MHC classe Ib, especialmente H2-M3, apresentam peptídeos N-formilados à células T CD8+. A imunização de camundongos com dois peptídeos N-formilados derivados de *M. tuberculosis* e ligados a H2-M3 resultou em resposta CTL e uma redução na carga bacteriana após o desafio com *M. tuberculosis* (Dow *et al*, 2000).

Parece que as funções primárias efetoras de células T CD8+ na tuberculose é lise das células infectadas e produção de citocinas, principalmente IFN- γ . Serbina *et al* (1999) têm reportado que células T CD8+ dos pulmões de camundongos infectados produzem IFN- γ e secretam essa citocina após a ligação do TCR ou por interação com células dendríticas infectadas com *M. tuberculosis*. Tascon *et al* (1998) propuseram que a proteção contra infecção por *M. tuberculosis* foi parcialmente dependente da produção de IFN- γ , quando células T CD8+ foram transferidas para camundongos *nude*.

A lise de células alvo por células T CD8+ pode ocorrer através de perforinas e granzimas ou via Fas/FasL. Kaufmann (1988 e 1993) têm hipotetizado que células T CD8+ tem a capacidade de lisar macrófagos infectados com *M. tuberculosis*; assim, liberando bactérias que poderão ser capturadas por outros macrófagos ativados dentro do granuloma.

Stenger *et al* (1997) descreveram que a morte de bactérias intracelulares é dependente de perforina, mas a lise mediada por Fas/FasL não promoveu este efeito. A perforina é requerida para formar os poros, mas a morte das bactérias intracelulares é mediada por granulicina (Stenger *et al*, 1998). Silva & Lowrie (2000) têm reportado que clones de células T CD8⁺ murinas Hsp65-específicas, que protegem camundongos desafiados com *M. tuberculosis*, são capazes de lisar macrófagos infectados através de mecanismo mediado por perforina.

1.3.3- Papel de células restritas a CD1:

Vários autores têm relatado que as células restritas à CD1 também apresentam papel importante na resposta contra a tuberculose. Essas células podem processar e apresentar antígenos micobacterianos às células T, especialmente CD4⁻8⁻, CD8⁺ e CD4⁺ (Sieling *et al*, 2000). As moléculas CD1 podem ser divididas em moléculas CD1 Grupo I (CD1a, CD1b e CD1c) e Grupo II (CD1d) (revisto por Porcelli *et al*, 1999). Camundongos carecem de moléculas CD1 grupo I; apresentam somente CD1d (moléculas CD1 grupo II). Geralmente, moléculas CD1 apresentam lipídeos ou glicolipídeos às células T, com exceção das moléculas CD1a que apresentam peptídeos. Moléculas CD1 são geralmente encontradas em células dendríticas *in vivo* (Sieling *et al*, 1999), embora baixos níveis de expressão em macrófagos sejam suficientes para permitir o reconhecimento por células T restritas a CD1 *in vivo*.

Em 1994, Beckmann *et al* mostraram pela primeira vez a apresentação de antígenos não protéicos por moléculas CD1, onde ácido micólico, componente

da parede celular de *Mycobacterium*, foi apresentado à moléculas CD1b. Outros antígenos lipídicos de micobactérias também tem sido apresentados a CD1, por exemplo, LAM (Sieling et al, 1995), fosfatidil inositol manosídeo (Sieling et al, 1995), glicose monomicolato (Moody et al, 1997) e glicolipídeos isoprenóides (Moody et al, 2000).

2- VACINA BCG (Bacilo de Calmette-Guérin):

A única vacina atualmente licenciada para prevenir a tuberculose é o BCG. Essa vacina foi desenvolvida por Albert Calmette e Camille Guérin no Instituto Pasteur, em 1908, onde obtiveram um isolado de *Mycobacterium bovis* a partir de mastite bovina. BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) é uma cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, bactéria filogeneticamente relacionada com *Mycobacterium tuberculosis* (Frothingham et al, 1994; Imaeda, 1985). A atenuação foi conseguida após 230 subcultivos, durante 13 anos (Grange et al, 1983).

Durante muitos anos, a vacina BCG foi utilizada em países em desenvolvimento como componente importante dos programas de controle da tuberculose (Huebner, 1996). É, rotineiramente, administrada a recém-nascidos em países onde a tuberculose é endêmica e em países de baixa incidência (Tala et al, 1997). Entretanto, a eficácia dessa vacina pode variar de 0 a 80% (Enserink, 2001). Ensaios clínicos têm revelado baixa efetividade do BCG em adultos, possivelmente isso deva estar associado à atenuação da vacina (Behr & Small, 1997). Vários autores têm relatado que ocorreram várias alterações genéticas no BCG, desde o início de sua utilização como estratégia de prevenção à

tuberculose, em 1921 (Behr & Small, 1999; Oettinger et al, 1999). Behr (2001) descreveu que essas alterações podem ser resultado de condições de cultivo diferentes às quais o BCG tem sido submetido durante este período.

3- NOVAS VACINAS CONTRA A TUBERCULOSE:

O conceito de vacinação foi utilizado pela primeira vez a mais de 200 anos por Edward Jenner, quando foi mostrado que a exposição anterior à varíola bovina poderia evitar a infecção de indivíduos pelo vírus da varíola humana. Desde então, vários autores têm desenvolvido várias vacinas contra doenças infecciosas.

Novas vacinas têm sido estudadas na intenção de melhorar a prevenção da tuberculose. Desde 1997, mais de 170 vacinas testadas em camundongos e cobaias têm mostrado resultados promissores. Os candidatos representam quatro tipos de vacinas: vacinas vivas, vacinas de subunidades e vacinas de DNA; além dessas, vacinas *prime-boost*.

(1) Vacinas vivas:

- **Vacinas auxotróficas:** Avanços na Bioinformática, Microbiologia Molecular e os estudos das sequências do genoma de *M. tuberculosis* e *M. bovis* BCG permitiram a atenuação racional de cepas de micobactérias. Essa atenuação pode ser gerada pela inativação de alguns genes, assim como, por mutações randômicas utilizando transposons. Os mutantes podem ser testados

para o fenótipo atenuado e, subsequentemente, para a imunogenicidade e eficácia protetora contra a tuberculose.

Candidatos a vacinas auxotróficas podem ser gerados utilizando essa mesma abordagem. Vacinas auxotróficas consistem de cepas de micobactérias vivas, por exemplo, BCG e *M. tuberculosis*, onde as vias de biossíntese de aminoácidos ou outros compostos essenciais têm sido desativadas. Como o BCG padrão, essas cepas nutricionalmente deficientes provocam uma infecção ativa no hospedeiro, mas a duração da replicação é limitada. Gulleria *et al* (1996) têm demonstrado que camundongos imunodeficientes morrem depois da imunização com o BCG padrão, mas não com o BCG auxotrófico, sugerindo que vacinas auxotróficas podem ser seguras em pacientes imunocomprometidos, por exemplo pacientes infectados pelo vírus HIV.

Outra abordagem para a atenuação é uma vacina pró-apoptótica, onde *M. tuberculosis* mutante ou BCG apresenta atividade da superóxido dismutase diminuída (Edwards *et al*, 2001). Kernodle *et al* (2001) demonstraram que animais imunizados com *M. tuberculosis* SOD-diminuídos apresentam aumento da apoptose das células infectadas com a cepa vacinal. Isso permite a cross-apresentação associada a apoptose através de MHC classe I, aumentando a morte mediada por células T CD8+ e a proteção contra a tuberculose.

- **BCG recombinante:** Uma cepa de BCG mais potente tem sido produzida pela introdução de um plasmídeo codificando uma proteína secretada de 30 kDa, também conhecida como antígeno 85B (Ag85B). Em cobaias, a imunização com BCG recombinante *over*-expressando Ag85B está associada a diminuição de

unidade formadoras de colônias no baço e pulmões dos animais infectados e aumento da taxa de sobrevivência em comparação ao BCG padrão (Horwitz *et al*, 2000; Horwitz *et al*, 1995).

- **Micobactérias saprófitas:** *M. vaccae*, *M. microti* e *M. smegmatis*, têm sido utilizadas como cepas vacinais. Estudos com *M. vaccae* têm demonstrado efeito protetor contra a tuberculose em modelos animais e geração de resposta citotóxica específica (Abou-Zeid *et al*, 1997; Skinner *et al*, 1997), apesar de Orme *et al* (2001) não terem verificado resposta imune específica em camundongos.

- ***Salmonella* Typhimurium atenuada:** Vários autores tem descrito que *Salmonella* Typhimurium pode ser utilizada como carreador heterólogo para vários antígenos micobacterianos. Hess *et al* (2000) têm demonstrado que *S. Typhimurium* expressando Ag85B induz secreção de citocinas e protege camundongos desafiados com *M. tuberculosis*.

(2) Vacinas de subunidades:

As vacinas de subunidade consistem de preparações de antígenos micobacterianos que são considerados imunogênicos e protetores em modelos animais. Muitos antígenos derivados de *M. tuberculosis* têm sido estudados, principalmente proteínas de superfície ou secretadas. As vacinas de subunidades podem ser oriundas de filtrado de cultura, proteínas individuais, misturas de proteínas e proteínas de fusão. Dos 170 candidatos testados em modelos animais, aproximadamente 50% são vacinas de subunidades (Orme *et al*, 2001).

Uma preparação de proteína contendo as proteínas secretadas ESAT-6 e Ag85 tem sido mostrado resultados promissores (Olsen *et al*, 2001).

(3) Vacinas de DNA:

As vacinas de DNA consistem de um DNA plasmidial codificando uma proteína antigênica de interesse. A imunização com uma vacina de DNA resulta na transfecção de células do hospedeiro e produção endógena do antígeno.

As vacinas de DNA contra *M. tuberculosis* tem sido exploradas por causa da efetividade variável do BCG. Trinta e duas novas vacinas de DNA tem sido testadas, individualmente ou combinadas (Sharma & Khuller, 2001, Morris *et al*, 2000). Pelo menos 10 vacinas testadas tem induzido proteção significativa em camundongos, incluindo DNA-MPT64 (codificante da proteína 23 kDa), DNA-Ag85 (proteínas 30, 31 e 31.5 kDa), DNA-ESAT6 (proteína 6 kDa), DNA-85B-MPT64-ESAT6, DNA-621pb de *M. bovis*, DNA-hsp65, DNA-Ag85B + GM-CSF (Sharma & Khuller, 2001).

(4) Vacinas *prime-boost*:

O termo *prime-boost* é baseado no conceito de sucessivas administrações do mesmo antígeno micobacteriano. Duas vacinas *prime-boost* são importantes candidatos para o controle da tuberculose. A primeira consiste da administração do BCG, seguida de imunização com MVA (vírus Ankara – vírus vaccinia modificado) expressando Ag85. A outra vacina constitui de DNA-ESAT + DNA-MPT63, seguida de *boost* com MVA expressando ESAT6 e MPT63. Essas

vacinas induzem resposta de célula T específica e proteção contra *M. tuberculosis* (McShane *et al*, 2001).

4- VACINAS DE DNA:

4.1 – MECANISMO DE AÇÃO:

Existem três mecanismos pelos quais o antígeno codificado pela vacina de DNA é processado e apresentado para induzir resposta imune (revisado por Gurunathan *et al*, 2000):

(I) Transfecção direta de células somáticas (miócitos, queratinócitos ou células MHC classe II negativas:

Os dados experimentais de Wolff e colaboradores demonstraram o sucesso da vacinação com DNA *in vivo* envolvendo a inoculação intramuscular direta do DNA, levando à expressão da proteína nas células transfectadas, sugerindo que as células musculares estão envolvidas na iniciação da resposta imune após a vacinação de DNA. Embora células musculares expressem MHC de classe I, elas não expressam outras moléculas de superfície celular, por exemplo CD80 e CD86, que são críticas para ativação de células T. De modo que, elas não são eficientes células apresentadoras de antígenos.

Ulmer *et al* (1996) demonstraram que a transferência de mioblastos transfectados com a nucleoproteína do vírus influenza protegeu camundongos desafiados. Entretanto, Agadjanyan *et al* (1999) mostraram que as respostas de

CTL antígeno- específica poderiam ser induzida por células musculares somente quando os camundongos fossem imunizados com antígeno e CD86.

Recentemente, têm sido mostrado que as principais células transfectadas pela vacina de DNA na pele são queratinócitos e células de Langerhans (Yang *et al*, 1990; Raz *et al*, 1994). A remoção da pele logo após a imunização com DNA evitou o desenvolvimento da resposta imune (Torres *et al*, 1997). Além disso, o transplante da pele dos animais imunizados até 12 horas após a imunização poderia evocar resposta imune em animais *naive* (Klinman *et al*, 1998). Contudo, se o transplante ocorrer 24 horas após a imunização, a resposta imune não é evocada eficientemente, sugerindo que as células que migram da epiderme dentro de 24 horas induziram a resposta primária após a imunização. As células transfectadas, que não migraram devem continuar a produzir antígeno para aumentar a magnitude da resposta imune (Akbari *et al*, 1999; Klinman *et al*, 1998).

(II) Transfecção direta de APCs profissionais, por exemplo, células dendríticas:

O primeiro estudo definindo os tipos de APCs que ativam células T após a imunização com DNA foi feito por Casares *et al* (1997). Esse estudo mostrou que células dendríticas, mas não células B ou queratinócitos de camundongos imunizados eram capazes de apresentar eficientemente antígenos às células T *in vitro*. Esses autores também estimaram que somente cerca de 0,4% de células dendríticas foram transfectadas com a vacina de DNA.

Porgador *et al* (1998) e Akbari *et al* (1999) também demonstraram que a injeção de DNA transfecta pequeno número de células dendríticas e que grande número de células dendríticas não transfectadas foram ativadas e migraram. Condon *et al* (1996) mostraram a visualização direta *in vivo* de células dendríticas dos linfonodos drenantes, expressando o antígeno, após a imunização utilizando o *gene gun*.

Células dendríticas têm função importante na indução da resposta imune após a imunização com DNA, envolvendo pequeno número de células transfectadas diretamente. Provavelmente, o grande número de células dendríticas não transfectadas diretamente, que migram para os linfonodos drenantes, participam de mecanismos adicionais de apresentação do antígeno como por exemplo *cross-priming*.

(III) *Cross-priming*, onde células somáticas e/ou APCs são transfectadas pela vacina de DNA e as proteínas secretadas são capturadas por outras células APCs profissionais e apresentadas às células T:

O conceito de *cross-priming* baseia na ativação de resposta de células T CD8+ sem necessidade de síntese *de novo* do antígeno nas APCs, promovendo um mecanismo adicional pelo qual a imunização com DNA pode aumentar a resposta imune. Durante o *cross-priming*, o antígeno ou peptídeo produzidos por células somáticas como miócitos ou queratinócitos podem ser capturados por APCs profissionais para iniciar as respostas de célula T.

A primeira evidência que a transferência do antígeno de miócitos para APCs profissionais poderia ocorrer *in vivo* na ausência da transfecção direta de células derivadas da medula óssea foi demonstrada pelos experimentos de Ulmer *et al* (1996) e Fu *et al* (1997), onde a transferência de mioblastos expressando nucleoproteína do vírus influenza em camundongos híbridos da geração F1 induziram respostas de CTL restritas pelo haplótipo MHC do camundongo recipiente.

Cross-priming pode ocorrer quando APCs profissionais processam os peptídeos ou proteínas secretadas de células somáticas e/ou outras APCs por fagocitose de corpos necróticos e apoptóticos (Albert *et al*, 1998; Albert *et al*, 1998a).

Essas evidências indicam que APCs derivadas da medula óssea, mas não células somáticas, induzem diretamente resposta imune após a imunização com DNA; sendo que, as células somáticas tais como miócitos (imunização intramuscular) ou queratinócitos (imunização intradérmica) servem como reservatórios do antígeno após a imunização com DNA, uma vez que essas células são transfectadas em maior número. Assim, células somáticas devem ser importantes na indução da resposta imune através do *cross-priming* e devem desempenhar papel fundamental no aumento e/ou manutenção da resposta imune.

4.2 - IMUNIDADE CELULAR INDUZIDA PELAS VACINAS DE DNA:

4.2.1 - RESPOSTA DE CÉLULAS T CD4+:

A presença de motivos CpG - seqüências contendo citosina e guanina não-metilada, que podem ser imunoestimulantes - no DNA bacteriano presente nas vacinas de DNA desencadeia resposta Th1 por induzir várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-12 (Krieg, 2002; Krieg, 2002a, Krieg, 2000b, Chu *et al*, 1997). Evidências adicionais de que a imunização com DNA favorece resposta Th1 são sustentadas pela observação de que o isotipo de imunoglobulina predominante detectado após a imunização é IgG2a (Roman *et al*, 1997). Entretanto, nem sempre as vacinas de DNA induzem resposta Th1. Pertmer *et al* (1996) foram os primeiros autores a demonstrar que camundongos imunizados repetidamente utilizando gene gun (via intradérmica) apresentam a produção de IL-4 aumentada, enquanto a produção de IFN-gama diminui concomitantemente. Além do perfil de citocinas, esses autores mostraram que a subclasse de imunoglobulina predominante após imunização por *gene gun* é IgG1. Em 1997, Feltquate *et al* compararam as diferenças no perfil de citocinas produzidas após imunização com gene gun e injeção intramuscular. A resposta Th2 e elevados títulos de IgG1 ocorrem preferencialmente após imunização com *gene gun*, já a resposta Th1 e elevados títulos de IgG2a são produzidos principalmente após imunização intramuscular.

4.2.2 – RESPOSTA DE CÉLULAS T CD8+:

Uma das vantagens das vacinas de DNA é a capacidade de gerar antígenos endogenamente, tornando-os acessíveis à via de processamento do MHC de classe I e, assim, e promovendo sua apresentação às células T CD8+ (Ulmer *et al*, 1993).

A imunização com a vacina de DNA codificante de uma proteína de LCMV induziu baixo número de precursores de CTLs antes da infecção pelo vírus; essas células se expandiram *in vivo* após a exposição ao patógeno (Martins *et al*, 1995; Yokoyama *et al*, 1995; Zarozinski *et al*, 1995). Em contrapartida, Fu *et al* (1997) descreveram que CTLs gerados de camundongos imunizados com DNA codificando nucleoproteína do vírus influenza efetuaram resposta imune comparável aos camundongos infectados pelo vírus influenza.

4.2.3 – RESPOSTA IMUNE HUMORAL:

A imunização com DNA é capaz de induzir elevados títulos de anticorpos em resposta a inúmeras proteínas. Além disso, a resposta humoral produzida pela imunização com DNA tem sido descrita como protetora em vários modelos animais.

Tem sido mostrado que a resposta de anticorpos produzida pela imunização com vacina de DNA codificando a hemaglutinina do vírus influenza alcança um platô entre 4 e 12 semanas após a imunização dos camundongos, independentemente, se as injeções foram simples ou múltiplas com dose ótima de DNA (Deck *et al*, 1997; Robinson *et al*, 1997). A imunização com DNA induz,

em geral, a produção de IgG1, predominantemente, para imunização intradérmica e IgG2a para imunização intramuscular.

4.2.4 – RESPOSTA PROTETORA:

Recentemente, tem sido demonstrado que células T CD4+ são ativadas nos linfonodos drenantes e migram para o baço, onde persistem por mais de 40 semanas na ausência do antígeno (Akbari *et al*, 1999). Vacinas de DNA podem induzir respostas de memória efetora Th1 *in vivo*. Tem sido demonstrado que a imunização com DNA codificando antígeno de *Leishmania* é mais eficiente que a imunização como proteína e IL-12 na manutenção das células Th1 antígeno específica, que são capazes de controlar a infecção (Gurunathan *et al*, 1998).

Poucos autores têm avaliado a resposta de célula T CD8+ por períodos prolongados após a vacinação com DNA. Raz *et al* (1994) têm descrito que a resposta CTL pode ser observada por mais de 68 semanas após a imunização intradérmica de DNA codificando nucleoproteína do vírus influenza. Davis *et al* (1995) também descreveram que as respostas de CTL induzida pela imunização com DNA codificando proteínas do envelope do vírus da hepatite B poderia ser detectada por mais de 4 meses após a imunização. A eficácia relativa da imunização com DNA em induzir células T CD8+ de memória deve-se a presença de motifs CpG, que são potentes estimuladores de interferons tipo 1 (Sun *et al*, 1998), principalmente IFN- α , que aumenta a proliferação de células T CD8+ de memória (Tough *et al*, 1996).

A imunização com DNA pode ser efetiva na indução de resposta humoral duradoura, dependendo do tipo de antígeno utilizado na vacina. Camundongos vacinados com DNA codificando hemaglutinina do vírus influenza apresentam níveis de anticorpos anti-hemaglutinina comparáveis ou maiores que aqueles dos animais infectados pelo vírus por mais de 1 ano (Raz *et al*, 1994; Deck *et al*, 1997). Já, outra vacina codificando uma nucleoproteína do vírus LCMV administrada por via intradérmica (Zarozinski *et al*, 1995) ou intramuscular (Martins *et al*, 1995) não induz resposta humoral significativa antes do desafio ou as respostas surgem 4 meses após a imunização.

4- VACINA pCDNA3-hsp65:

Na tentativa de contribuir para buscar alternativas de prevenção e tratamento para a tuberculose, o Centro de Pesquisas em Tuberculose, que está inserido na REDE-TB, coordenado pelo Dr. Célio Lopes Silva, desenvolveu a vacina pCDNA3-hsp65.

Inicialmente, Silva & Lowrie (1994) demonstraram que macrófagos murinos J774, transfectados com um vetor retroviral contendo o gene hsp65 de *Mycobacterium leprae*, foram capazes de conferir proteção em camundongos BALB/c infectados com *M. tuberculosis* H37Rv ou *M. bovis* BCG. Posteriormente, foi demonstrado que a proteção envolvia a participação de células T CD4+ e CD8+ (Bonato *et al*, 1998; Silva *et al*, 1999). Injeções intramusculares de vacinas de DNA codificando Hsp65 de *M. leprae* (pCDNA3-hsp65 e pHMG-hsp65) induziram o desencadeamento de resposta imune humoral e celular, corroborando com os

dados anteriores obtidos com os macrófagos infectados. Além disso, animais imunizados com essas vacinas foram protegidos contra desafio com *M. tuberculosis* (Bonato *et al*, 1998; Silva *et al*, 1999). Em 1999, Lowrie *et al* demonstraram a atividade terapêutica dessa vacina utilizando camundongos BALB/c previamente infectados com *M. tuberculosis*. Assim, pCDNA3-hsp65 tem a capacidade de (1) prevenir o estabelecimento da infecção e da doença, (2) eliminar a infecção causada por *M. tuberculosis*, (3) resolver casos de tuberculose induzida por bactérias resistente à isoniazida e (4) impedir a reativação da doença quando os animais são submetidos a imunossupressão pelo tratamento com corticóides (Lowrie *et al*, 1999).

A vacina pCDNA3-hsp65 é codificante da proteína de choque térmico de 65kDa (Hsp65) de *Mycobacterium leprae*. As proteínas de choque térmico (Hsp) são produzidas por células eucarióticas e procarióticas em resposta às intempéries do ambiente, como por exemplo aumento brusco de temperatura (Lindquist, 1986; Lindquist & Craig, 1988). O termo proteínas de choque térmico foi introduzido pela primeira vez por Ritossa em 1962, quando descreveu que após choque térmico, um padrão alterado de *puffing* nos cromossomos das glândulas salivares de *Drosophila melanogaster* (Ritossa, 1996). Corroborando com esses dados, Lindquist & Craig (1988) sugeriram que Hsps foram efetivas na prevenção do enovelamento de proteínas a altas temperaturas. Entretanto, muitos outros fatores que causam estresse celular, além de elevadas temperaturas, são responsáveis pela indução da síntese de Hsps; daí, foi introduzido o termo "proteínas de estresse".

Várias famílias de Hsps estão descritas na literatura. Membros das famílias da Hsp60 e Hsp70 tem função no dobramento, desdobramento e translocação de polipeptídeos assim como na montagem e desmontagem de oligômeros de proteínas (Reading *et al*, 1989; Cheng *et al*, 1989; Hemmingsen *et al*, 1988; Osterman *et al*, 1989; Goloubinoff *et al*, 1989; Chirico *et al*, 1988; Deshaies *et al*, 1988). A presença de proteínas desnaturadas dentro da célula induz a síntese de Hsps através de mecanismo de *feed-back* positivo (Anathan *et al*, 1986).

Kauffman (1990) têm evidenciado que as Hsps são os principais antígenos de muitos patógenos. O primeiro a ser identificado foi Hsp65 de *M. leprae* (Thole & Van der Zee, 1990). Hsp65 é provavelmente o antígeno micobacteriano mais bem estudado até o momento. É considerado um antígeno imunodominante (Kaufmann *et al*, 1987). Em indivíduos e animais infectados ou imunizados com micobactérias, encontra-se um vasto repertório de anticorpos e células T reativas à Hsp65 de *M. leprae*. Já foram reconhecidos alguns epitopos das proteínas Hsp65, presentes em *M. tuberculosis* e *M. leprae* (Mehra *et al*, 1986; Mustafa *et al*, 1996; Mustafa *et al*, 1999; Thole & Van der Zee, 1990).

A análise das seqüências de DNA dos genes codificantes da Hsp65 em diferentes micobactérias revelou uma elevada identidade entre estas seqüências. Os genes hsp65 de *M. tuberculosis* e *M. leprae* apresentam 90% de identidade. Esse percentual de identidade é superior aquele encontrado entre os genomas dessas duas bactérias, que é de apenas 20 a 30% (Clark-Curtiss, 1990). A elevada identidade entre as seqüências de hsp65 de *M. leprae* e *M. tuberculosis* se estende à região *upstream* do gene, de modo que ocorre 80% de identidade

em um fragmento de 200 pb. O restante da região *upstream*, após esse fragmento de 200 pb, e a região *downstream* possuem 45% de identidade.

É válido ressaltar que a vacina de DNA contendo o gene *hsp65* de *M. tuberculosis* (pCDNA3-*hsp60*) não foi capaz de induzir proteção nem atividade terapêutica como aquela mostrada nos trabalhos do Centro de Pesquisas em Tuberculose (pCDNA3-*hsp65*) (Turner *et al*, 2000; Turner *et al*, 2000). O fragmento de DNA, incluído na vacina pCDNA3-*hsp65*, contém o gene codificante de *hsp65* de *M. leprae* e um fragmento *downstream* a esse gene (1324 pb), que não possui fases abertas de leitura (ORF) em ambas as fitas de DNA.

II – JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS:

Embora tenha sido demonstrada a eficácia da vacina pCDNA3-hsp65 (*Mycobacterium leprae*) no desencadeamento da resposta protetora contra a tuberculose em animais infectados, uma investigação mais refinada da resposta imune desencadeada por diferentes fragmentos do inserto dessa vacina ainda não foi realizada. Em particular, ainda não foi avaliada a influência do fragmento *downstream* ao gene hsp65 na indução da resposta imune pela vacina.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo geral investigar a imunogenicidade de diferentes fragmentos da vacina pCDNA3-hsp65. Para tanto, propusemo-nos a:

- (1) Obter novas construções de DNA a partir da vacina pCDNA3-hsp65, através de clonagem no vetor pCDNA3;
- (2) Imunizar camundongos BALB/c utilizando duas vias de administração: via intradérmica e via intramuscular;
- (3) Avaliar a resposta imune humoral através da quantificação dos títulos de anticorpos no soro dos animais imunizados;
- (4) Avaliar a resposta imune celular através da proliferação de células totais do baço e linfonodos inguinais, do perfil de citocinas produzido *in vitro* por essas células e do influxo de macrófagos, células dendríticas, linfócitos B, linfócitos T, incluindo as subpopulações células T CD4⁺ e CD8⁺ para os baços dos animais imunizados.

III- MATERIAL E MÉTODOS:

1- ANIMAIS:

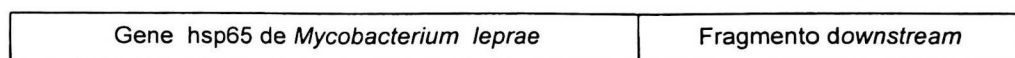
Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, fêmeas, 5 a 6 semanas de idade, provenientes do Biotério de Animais Isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

2- CLONAGEM DE NOVAS CONSTRUÇÕES DE DNA A PARTIR DA VACINA pCDNA3-hsp65:

A clonagem de novas construções de DNA foi realizada em colaboração com Dra. Sylvia Cardoso Leão (UNIFESP). A construção vacinal original pCDNA3-hsp65 foi utilizada como ferramenta para a obtenção de novas construções de DNA contendo diferentes fragmentos do inserto. A vacina foi obtida por clonagem de um fragmento *Xmnl* de 3,1 kb proveniente do genoma de *M. leprae*, contendo o gene *hsp65* e um fragmento *downstream* de 1324 pb. Esses fragmentos de DNA foram clonados, inicialmente, no vetor pHMG digerido com *EcoRV* (Gautier *et al*, 1989). Um fragmento de 3,3 kb contendo o inserto de *M. leprae* e a sequência poliA do vetor pHMG foi excisado e subclonado no plasmídeo pCDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), linearizado com 10 U de *BamHI* e desfosforilado com CIAP (Gibco/BRL) (Tascon *et al*, 1996).

O inserto da vacina (gene hsp65 de *M. leprae* e fragmento *downstream* de 1424 pb) apresenta quatro sítios de restrição para a enzima *Xho*I, localizados nas posições +59, +569, +1820, +3144 (ver esquema abaixo), considerando o sítio de restrição *Bam*HI como posição 1+.

*Bam*HI *Xho*I *Xho*I *Xho*I *Not*I /*Xho*I
 1+ _____ 59 _____ 569 _____ 1820 _____ 3144



A vacina pCDNA3-hsp65 foi digerida parcialmente com 0,2 U da enzima *Xho*I por 45 minutos a 37°C. Os produtos da digestão foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X (Tris 40mM, ácido acético 1,14% e EDTA 2 mM, pH 8,0) e corados com brometo de etídio 1 µg/mL. Fragmentos do inserto de tamanhos variados foram extraídos do gel de agarose com Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc, Valencia, CA, USA) e ligados no vetor pCDNA3 defosforilado com CIAP (Gibco/BRL, Life Tech, Rockville, MD, EUA). Os produtos da ligação foram transformados em *Escherichia coli* DH5α por eletroporação e os transformantes foram cultivados em LB ágar/ampicilina. O DNA plasmideal foi extraído por mini-preparação e sequenciados utilizando *primers* específicos para confirmar a orientação correta do inserto.

3- EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES DE DNA:

A partir de cada estoque congelado de *Escherichia coli* DH5 α transformada, os clones foram cultivados em LB ágar contendo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina a 37°C, durante uma noite. Uma colônia isolada de cada clone foi semeada em 10 mL de caldo LB contendo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina. Um inóculo diluído 1:100 em 500 mL de caldo LB contendo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina foi incubado a 37°C, durante 1 noite. Os plasmídeos foram purificados com Concert High Purity Plasmid Maxiprep System (Gibco/BRL, Life Tech, Rockville, MD, EUA). Os produtos da purificação foram quantificados em GeneQuant II (Pharmacia Biotech), digeridos com 10 U (1 μL) de *Xho*I a 37°C durante 2 horas e submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para verificar se as construções estavam realmente purificadas.

4- PREPARAÇÃO DO DNA PARA IMUNIZAÇÃO:

4.1- IMUNIZAÇÃO INTRADÉRMICA (GENE GUN):

As construções de DNA utilizadas para a imunização intradérmica foram preparadas de acordo o protocolo disponível pela BioRad® para o sistema de biobalística através Helios Gene Gun System.

Uma suspensão de 25 mg de partículas de ouro (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) e 100 μL de espermidina 0,05M (Sigma Chemical Co, St

Louis, MO,USA) foi homogeneizada por cinco segundos no vortex e 50 μ L de cada construção de DNA na concentração de 1 μ g/ μ L foram adicionados. A mistura foi homogeneizada no vortex por 5 segundos e, por gotejamento, 200 μ L de CaCl₂ 1.0 M (Sigma Chemical Co, St Louis, MO,USA) foram adicionados. A suspensão foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e, posteriormente, centrifugada por 15 segundos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado três vezes com 1 mL de etanol 100% (Sigma Chemical Co, St Louis, MO,USA). O DNA adsorvido no ouro foi ressuspenso em 3 mL de PVP (Sigma Chemical Co, St Louis, MO,USA) dissolvido em etanol (0,1 mg/mL). Os cartuchos utilizados na imunização intradérmica foram preparados utilizando tubos fornecidos no *Cartridge* kit (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) acoplados ao *Tubing Prep Station* (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA), seguindo as instruções do manual de manipulação do equipamento.

4.2- IMUNIZAÇÃO INTRAMUSCULAR:

O DNA plasmidial purificado correspondente a cada construção teve sua concentração final acertada para 2 mg/mL em tampão PBS 1X estéril e foi, posteriormente, dissolvido em sacarose 50% estéril (v/v). A sacarose foi utilizada com a finalidade de promover um estímulo inflamatório, que recruta células para o local de administração do DNA nu.

5- IMUNIZAÇÃO COM AS CONSTRUÇÕES DE DNA:

Grupos constituídos por 5 camundongos BALB/c foram imunizados por duas diferentes vias: via intramuscular por injeção do DNA nos músculos quadríceps e via intradérmica por bombardeamento das construções adsorvidas em partículas de ouro utilizando Helios Gene Gun System (Bio Rad). Dois grupos controle foram considerados - animais imunizados com vetor pCDNA3 e animais não imunizados.

5.1- IMUNIZAÇÃO INTRADÉRMICA (Gene Gun):

Os animais foram imunizados com os cartuchos contendo as construções de DNA adsorvidas em partículas de ouro através de bombardeamento utilizando Helios Gene Gun System (Bio Rad) sob uma pressão 260 psi. O DNA adsorvido em partículas de ouro (1µg/µL) foi bombardeado na pele da região abdominal previamente depilada com creme depilatório comercial seguindo-se as instruções do fabricante, depois o creme foi removido com etanol 70%. Três imunizações foram feitas, com um intervalo de 15 dias entre elas (Ver esquema abaixo). Os animais foram sacrificados, por inalação de éter etílico, 30 dias após a 3ª imunização. Para avaliação da resposta imune celular, 3 dias antes do sacrifício cada animal recebeu um *booster* (Ramshaw & Ramsay, 2000) com 10 µg de proteína Hsp65 recombinante dissolvida em PBS estéril, por via endovenosa.

Tem sido descrito na literatura que o *booster* é necessário para expandir clones de células T de memória antígeno- específicas antes dos ensaios *in vitro*.

ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO INTRADÉRMICA DOS ANIMAIS



1 = 1^a imunização

2 = 2^a imunização

3 = 3^a imunização

4 = *Booster* com 10 µg de Hsp65

5 = Sacrifício

5.2- IMUNIZAÇÃO INTRAMUSCULAR:

Os animais receberam três doses de DNA (100 µg de DNA/animal) injetadas nos músculos quadríceps direito e esquerdo. Entre cada imunização, foi estabelecido um intervalo de 15 dias. Os camundongos foram sacrificados, por inalação de éter etílico, 30 dias após a 3^a imunização. Assim como foi realizado para a imunização intradérmica, 3 dias antes do sacrifício cada animal recebeu um *booster* (Ramshaw & Ramsay, 2000) com 10 µg de proteína Hsp65 recombinante dissolvida em PBS estéril, por via endovenosa, para avaliar da resposta imune celular.

ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO INTRAMUSCULAR DOS ANIMAIS



1 = 1ª imunização

2 = 2ª imunização

3 = 3ª imunização

4 = *Booster* com 10 µg de Hsp65

5 = Sacrifício

6- EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Hsp65 RECOMBINANTE:

As bactérias *Escherichia coli* DH5α contendo o plasmídeo pIL161 codificante da Hsp65 foram submetidas à indução com IPTG (isopropil-tio-β-D-galactosídeo). Após a indução, as bactérias foram centrifugadas 14 000 rpm por 5 minutos a 4°C e o precipitado foi lavado três vezes com tampão CE (citrato de sódio 30 mM, EDTA 10 mM, pH 6,0) e, em seguida, ressuspendido em tampão UPE (uréia 6M, tampão fosfato 50 mM pH 7,0 e EDTA 20 mM). As bactérias foram lisadas com sonicador em banho de gelo, cinco vezes durante 10 segundos e centrifugadas a 14000 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi reservado e precipitado com sulfato de amônio 1,0 M (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) em banho de gelo por 30 minutos. O produto da precipitação foi centrifugado a 14

000 rpm por 10 minutos a 4°C, ressuspensionado em tampão Tris-HCl 40 mM/ NaCl 20mM, pH 7,0 e dialisado em sacos de diálise (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) contra o mesmo tampão.

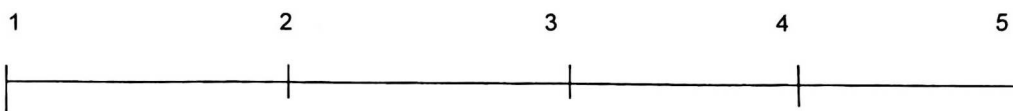
As proteínas foram filtradas e quantificadas por dosagem colorimétrica utilizando Comassie Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, Illinois, USA). A densidade ótica foi medida a 600 nm em espectrofotômetro (Metertech Σ960). Uma amostra de proteína foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) em sistema descontínuo, sob condições desnaturantes, em tampão de corrida 1X (Glicina 0,96M, Tris 1M, SDS 0,2%, pH 8,0) para se verificar o grau de pureza das amostras. A proteína foi diluída em tampão de amostra (azul de bromofenol 0,1%, Tris-HCl 0,1M pH 6,8, SDS 10%, Glicerol 50%) contendo 2-mercaptoetanol 0,25%. Em seguida, o gel foi descorado com água em ebulição. As proteínas, então, foram aliqüotadas em tubos estéreis e armazenadas a - 70°C.

7- AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DOS ANIMAIS IMUNIZADOS:

7.1- RESPOSTA IMUNE HUMORAL:

A resposta imune humoral foi avaliada através da produção de anticorpos anti-Hsp65 por ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) nas amostras de soro coletadas dos animais imunizados com as construções de DNA, de acordo com o esquema abaixo.

OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO DOS ANIMAIS IMUNIZADOS



1 = Soro T0 (pré-imune) - obtido antes da 1ª imunização

2 = Soro T1 - obtido antes da 2ª imunização

3 = Soro T2 - obtido antes da 3ª Imunização

4 = Soro T3 - obtido 15 dias após a 3ª Imunização

5 = Soro T4 - obtido 30 dias após a 3ª Imunização - dia do sacrifício

A detecção de anticorpos anti-Hsp65 no soro dos animais imunizados com as proteínas foi realizada seguindo o protocolo de ELISA (PharMingen, San Diego, CA, USA). Placa de ELISA 96 Wells (Corning Inc, Corning, NY, USA) foram cobertas com 100 μ L da proteína Hsp65 recombinante 5 μ g/mL diluída em tampão de sensibilização (Na_2CO_3 17mM, NaHCO_3 9,6mM, pH 9,6) e incubadas a 4°C, durante 1 noite. As placas foram lavadas 5 vezes com PBS 1X/Tween 20 0,05% para remover o excesso de proteína. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com 200 μ L de PBS 1X/ Tween 20 0,05%/ soro bovino fetal 5%. As placas foram incubadas a 37°C por 1 hora e, em seguida, lavadas novamente. Um volume de 100 μ L de cada amostra de soro foi diluído (1:10, 1:100 e 1:1000) em tampão de bloqueio, adicionado à placa e incubado a 37°C por 1 hora. As placas foram novamente lavadas e incubadas a 37°C por 1 hora com 100 μ L de anticorpo

biotinilado anti-IgG (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA), anti-IgG1 (PharMingen, San Diego, CA, USA) e anti-IgG2a (PharMingen, San Diego, CA, USA) de camundongo, diluído 1:1000 em tampão de bloqueio. Após esse tempo de incubação, procedeu-se outra lavagem das placas. As placas foram incubadas com 100 μ L de complexo estreptavidina-peroxidase (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) sob a proteção da luz, à temperatura ambiente. A reação colorimétrica foi revelada com 100 μ L de solução de OPD/ H₂O₂ (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) e bloqueada com 50 μ L de H₂SO₄ 16%. A absorvância foi determinada no leitor de ELISA (Metertech Σ 960) a 490nm.

7.2- RESPOSTA IMUNE CELULAR:

A resposta imune celular foi avaliada através de proliferação de células totais do baço e linfonodos inguinais por incorporação de timidina triciada, determinação do perfil das citocinas IL-4 IL-10, IFN-gama e IL-12, por ELISA, no sobrenadante de cultura de células totais do baço e dos linfonodos inguinais e avaliação, por FACS, do influxo de macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e T, incluindo células T CD4+ e CD8+ para o baço.

7.2.1- PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS:

A proliferação de células foi realizada com células totais do baço e linfonodos inguinais dos animais imunizados com as construções de DNA, através de incorporação de timidina triciada (Pharmacia, UK).

Os animais foram sacrificados e os baços foram removidos e coletados em tubos contendo 2 mL de meio RPMI incompleto (RPMI 1640/ HEPES 10 mM/ NaHCO₃ 12 mM/ glutamina 2 mM, pH 7,3). Os baços foram divulsionados e as hemáceas foram lisadas com tampão Tris 0,17M/ NH₄Cl 0,16 M e incubadas a 4°C por 10 minutos, sob a proteção da luz. A suspensão de células foi lavada com PBS 1X estéril e centrifugada a 400 xg por 5 minutos a 4°C. O sedimento celular foi ressuspensos em 1 mL de meio RPMI 1640 completo pH 7,3 (RPMI 1640/ HEPES 10 mM/ NaHCO₃ 12 mM/ glutamina 2 mM/ penicilina 100000 U/mL/ estreptomicina 100000 U/mL/ 2-mercaptoetanol 0,05M/ soro bovino fetal 10%). As células do baço foram contadas em câmara de Neubauer e ajustados para concentração de 5×10^6 células/ mL em meio RPMI 1640 completo. As células foram distribuídas em placa de cultura de células 96 poços (Corning Co, Corning, NY, USA) (100 µL/ poço) e foram estimulados com 40 µg/ mL de Concanavalina A Tipo IV (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) e com a proteína Hsp65 recombinante 20 µg/mL. As células foram incubadas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C por 54 horas. Em seguida, a cultura foi pulsada com 0,5 µCi/ poço de timidina triciada (Pharmacia, UK) e novamente incubadas em estufa de CO₂ a 37°C por 18 horas. As células foram coletadas no coletor de células (Cambridge

Technology Incorporation, Modelo 200A). A leitura do radionuclídeo incorporado nas células em proliferação foi realizada no contador de cintilação β (Beckman).

7.2.2- DOSAGEM DE CITOCINAS:

A produção de citocinas foi detectada no sobrenadante de cultura de células totais do baço e linfonodos inguinais dos animais imunizados com as construções de DNA através de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay),

As células de baço foram cultivadas durante 48 horas a 37°C em estufa, contendo 5% de CO₂ na presença dos estímulos concanavalina A Tipo IV 4 µg/mL (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) ou *Staphylococcus aureus* Cowan I (Calbiochem, USA) diluído 1:5000 ou proteína Hsp65 selvagem 40 µg/mL.

A detecção de citocinas no sobrenadante de cultura de células de baço foi realizada seguindo protocolo de ELISA (PharMingen, San Diego, CA, USA). A cobertura das placas de ELISA 96 poços (Corning Co, Corning, NY, USA) foi feita com 100 µL/poço dos anticorpos purificados anti-IL-4 ou anti-IL-10 ou anti-IFN- γ ou anti-IL-12, diluídos 1:1000 em tampão de sensibilização (Na₂HPO₄ 0,1M pH 9,0). As placas foram incubadas a 4°C, durante 1 noite. Depois, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS 1X/Tween 20 0,05% para remover o excesso de proteína. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com 200 µL de PBS 1X/Tween 20 0,05%/ soro bovino fetal 5% a temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, as placas foram lavadas novamente. Um volume de 100 µL de cada amostra de sobrenadante foi adicionado às placas e incubadas a 4°C por 1 noite;

os sobrenadantes das células estimuladas com Concanavalina A e *Staphylococcus aureus* foram diluídos 1:4 e 1:2, respectivamente. As respectivas curvas foram feitas utilizando citocinas recombinantes purificadas IL-4, IL-10, IFN- γ e IL-12 (PharMingen, San Diego, CA, USA) diluídas, na base 2, em tampão de bloqueio. As placas foram novamente lavadas e incubadas a 37°C por 1 hora com 100 μ L de anticorpo biotinilado anti-IL-4, anti-IL-10, anti-IFN- γ e anti-IL-12 (PharMingen, San Diego, CA, USA) de camundongo, diluído 1:1000 em tampão de bloqueio. Após esse tempo de incubação, procederam-se novas lavagens. As placas foram incubadas com 100 μ L de complexo estreptavidina-peroxidase (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) sob a proteção da luz, à temperatura ambiente por 30 minutos. A reação colorimétrica foi revelada com 100 μ L de OPD/ H₂O₂ (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) e bloqueada com 50 μ L de H₂SO₄ 16%. A absorbância foi determinada no leitor de ELISA (Metertech Σ 960) a 490nm.

7.2.3- AVALIAÇÃO DO INFLUXO DE POPULAÇÕES CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO - MARCAÇÃO *ex vivo*:

Uma suspensão de 10⁶ células totais do baço/mL foi colocada em tubos FACS e incubada com 0,5 μ g de *FcBlock* (anti-CD16/CD32) (PharMingen, San Diego, CA, USA) durante 45 minutos a 4°C. Em seguida, os anticorpos monoclonais de interesse, marcados com FITC (isotiocianato de fluoresceína) ou PE (ficoeritrina) foram adicionados na concentração discriminada na tabela abaixo. Células marcadas com anticorpos irrelevantes serviram como controle do

experimento. As células foram incubadas a 4°C por 30 minutos sob proteção da luz. O excesso de anticorpo monoclonal fluorescente foi removido com 2 mL de PBS 1X/ soro bovino fetal 2%. As células marcadas foram então centrifugadas a 400 x g a 4°C por 10 minutos. As suspensões foram ressuspensas em 500 µL de PBS 1X/ formaldeído 1% e analisadas no FACsort (Becton & Dickinson, USA), sendo coletados 10000 eventos por amostra. A análise foi realizada pelo programa Cell Quest. A população de linfócitos foi selecionada através dos parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) para avaliação das subpopulações CD3⁺ e CD19⁺, que caracterizam os linfócitos T e B, respectivamente. Além disso, também foram avaliadas, as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. As populações de macrófagos e células dendríticas também foram selecionadas pelos parâmetros de tamanho e granularidade e avaliadas quanto à expressão de CD11b, para a caracterização de macrófagos, e quanto à expressão de CD11c, para a caracterização de células dendríticas.

| Anticorpo monoclonal irrelevante | | Anticorpo monoclonal de interesse | |
|----------------------------------|------------|-----------------------------------|------------|
| Anticorpo Marcado | Quantidade | Anticorpo marcado | Quantidade |
| IgG2a rato- FITC | 15 ng/µL | CD4 – FITC | 15 ng/µL |
| IgG2a rato - PE | 20ng/µL | CD8 - PE | 20ng/µL |
| IgG hamster – FITC | 15 ng/µL | CD3ε - FITC | 15 ng/µL |
| IgG2a rato - PE | 20ng/µL | CD19 - PE | 20ng/µL |
| IgG2b rato – FITC | 15 ng/µL | CD11b - FITC | 15 ng/µL |
| IgG hamster - PE | 20ng/µL | CD11c - PE | 20ng/µL |

7- DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE MOTIFS CpG PRESENTES NAS CONSTRUÇÕES DE DNA:

Cinco *motifs* CpGs foram pesquisados no inserto da vacina e seus fragmentos. Dois destes são CpG-S (imunoestimulatórios), sendo seqüências estimulantes de células de camundongos (GACGTT e AACGTT) e dois motifs são CpG-N (neutralizantes) (GCCGTT e CGCGCG).

CpG-S constituem seqüências CG não metiladas, palindrômicas, que estimulam células B, células NK, células dendríticas e macrófagos (Yi *et al*, 1998; Krieg *et al*, 1995). Apresentam-se, geralmente, flanqueados por duas purinas na extremidade 5' e duas pirimidinas na extremidade 3', assumindo a fórmula PurPurCGPyrPyr (Krieg, 2002). CpG-N são seqüências CG não metiladas, que antagonizam os efeitos dos *motifs* imunoestimulatórios (Krieg *et al*, 1998).

Para determinar os *motifs* CpGs no inserto da vacina e seus fragmentos, a seqüência do inserto foi submetida ao programa DNAsis (Hitashi, USA) e a análise foi realizada, buscando os *motifs* CpG GACGTT, AACGTT, GCCGTT e CGCGCG.

9- ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente, empregando-se a análise de variância ANOVA, seguida do teste de Tukey. O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

V- RESULTADOS:

1- CLONAGEM DAS NOVAS CONSTRUÇÕES DE DNA:

A clonagem de novas construções de DNA foi realizada em colaboração com Dra. Sylvia Cardoso Leão (UNIFESP). A construção vacinal original pCDNA3-hsp65 foi utilizada como ferramenta para a obtenção de novas construções de DNA contendo diferentes fragmentos do inserto. A vacina pCDNA3-hsp65 foi digerida parcialmente com *Xho*I por 45 minutos a 37°C e os produtos da digestão foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X e corados com brometo de etídio (Figura 1). Fragmentos do inserto de tamanhos variados (Tabela 1) foram extraídos do gel de agarose e ligados no vetor pCDNA3 defosforilado com CIAP.

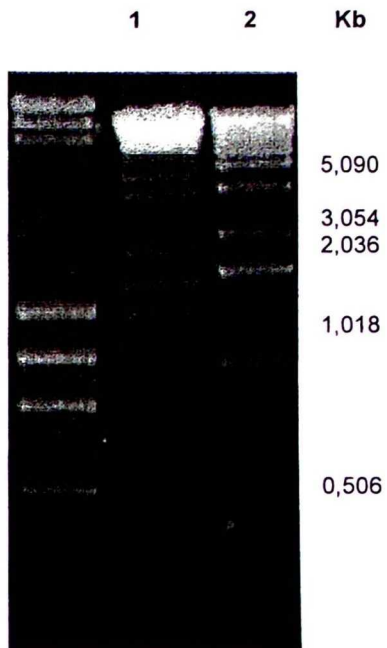


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X dos produtos da digestão parcial da vacina pcDNA3-Hsp65. (1) digestão com 0,2 U de XhoI por 45 minutos a 37°C; (2) 1 kb DNA ladder.

Tabela 1 – Produtos da digestão parcial da vacina pcDNA3-hsp65.

| PRODUTO DA DIGESTÃO COM <i>Xho</i> I (pb) | COMPOSIÇÃO |
|--|---|
| 8527 | Vacina pcDNA3-hsp65 linearizada |
| 7258 | pcDNA3 + fragmento codificador da região N-terminal da Hsp65 (510 pb) + fragmento <i>downstream</i> adicional (1324 pb) |
| 7185 | pcDNA3 + gene hsp65 (1761 pb) (sem o fragmento <i>downstream</i>) |
| 6766 | pcDNA3 + fragmento <i>downstream</i> (1342 pb) |
| 5934 | pcDNA3 + fragmento codificador da região N-terminal da Hsp65 (510 pb) |
| 5424 | pcDNA3 (vetor) |
| 2575 | Fragmento codificador da região C-terminal da Hsp65 (1251 pb) + fragmento <i>downstream</i> (1324 pb) |
| 1751 | Gene hsp65 (1751 pb) (sem o fragmento <i>downstream</i>) |
| 1342 | Fragmento <i>downstream</i> (1342 pb) |
| 1251 | Fragmento codificador da região C-terminal da Hsp65 (1251 pb) |
| 510 | Fragmento codificador da região N-terminal da Hsp65 (510 pb) |

2- EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES DE DNA:

Os clones transformados com o inserto na posição correta foram estocados e cultivados em meio LB/ampicilina para obtenção do DNA plasmideal. As construções de DNA foram digeridas com 10 U de *Xho*I e submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%, tampão TAE1X. As figuras 2 e 3 mostram os fragmentos das construções de DNA restritos com *Xho*I. De acordo com a figura 2, a construção vacinal original foi clivada em 4 fragmentos: vetor pCDNA3 (5,4 kb), fragmento *downstream* (1,3 kb) e dois fragmentos do gene hsp65 (1,2 kb e 510 pb); pCDNA3-N59 não é clivada com *Xho*I; pCDNA3-hsp65G é restrita a três fragmentos: vetor (5,4 kb) e dois fragmentos do gene hsp65 (1,2 kb e 500 pb); pCDNA3-N é restrita a dois fragmentos: vetor (5,4 kb) e fragmento do gene hsp65 (510 pb).

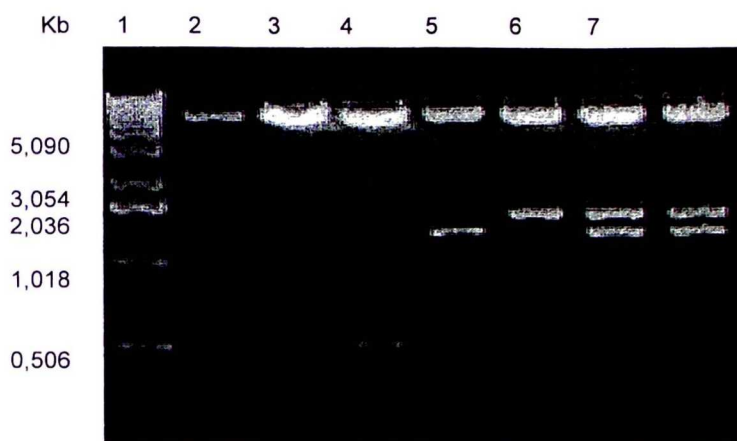


Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X das construções de DNA digeridas com *XhoI*. (1) 1 kb DNA *ladder*, (2) pCDNA3, (3) pCDNA3-N59, (4) pCDNA3-N, (5) pCDNA3-hsp65G, (6) pCDNA3-DS, (7) pCDNA3-hsp65.

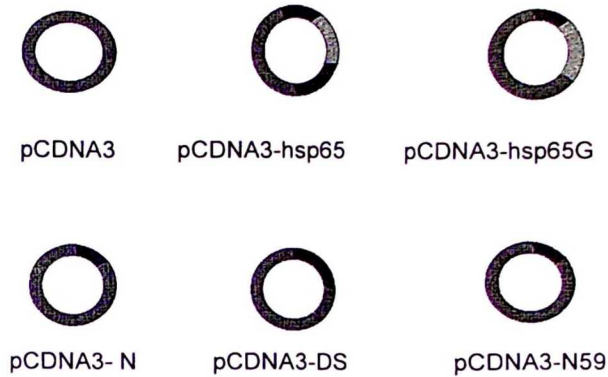


Figura 3 – Desenho esquemático das construções de DNA. Em cinza, vetor pCDNA3; em roxo, fragmento codificante da extremidade N-terminal da Hsp65; em laranja, fragmento codificante da extremidade C-terminal da Hsp65 e em verde, fragmento *downstream*. **pCDNA3** = vetor; **pCDNA3-hsp65** = vetor + fragmento codificante da extremidade N-terminal da Hsp65 + fragmento codificante da extremidade C-terminal da Hsp65 + fragmento *downstream*, **pCDNA3-hsp65G** = vetor + fragmento codificante da extremidade N-terminal da Hsp65 + fragmento codificante da extremidade C-terminal da Hsp65, **pCDNA3-N** = vetor + fragmento codificante da extremidade N-terminal da Hsp65, **pCDNA3-DS** = vetor + fragmento *downstream* e **pCDNA3-N59** = vetor + 59 pb codificante da extremidade N-terminal da Hsp65.

3- EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Hsp65 RECOMBINANTE:

A proteína Hsp65 recombinante foi extraída e purificada, de acordo com protocolo previamente descrito em Material e Métodos, e submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, sob condições redutoras, em tampão de corrida 1X (Figura 4).

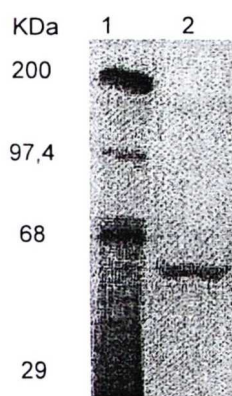


Figura 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em sistema descontínuo sob condições desnaturantes. A proteína purificada foi diluída em tampão de amostra contendo 2-mercaptoetanol 0,25%. O gel foi descorado, após a corrida, com água em ebulição. (1) Padrão de alto peso molecular e (2) Hsp65 recombinante.

4- AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NOS ANIMAIS IMUNIZADOS:

4.1- RESPOSTA IMUNE HUMORAL:

A resposta imune humoral foi avaliada através da determinação dos títulos de anticorpos anti-Hsp65 por ELISA de acordo com protocolo descrito anteriormente.

4.1.1 - RESPOSTA IMUNE HUMORAL DOS ANIMAIS IMUNIZADOS POR VIA INTRADÉRMICA (GENE GUN):

Os animais imunizados com as construções pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G produziram títulos significativos de IgG anti-Hsp65 (Figura 5), IgG1 anti-Hsp65 (Figura 6) e IgG2a anti-Hsp65 (Figura 7) em relação aos controles (não imunizado e pCDNA3). A resposta de anticorpos induzida por pCDNA3-hsp65 foi maior que a resposta induzida por pCDNA3-hsp65G.

As diferenças nos títulos de IgG, IgG1 e IgG2a, em relação aos controles, foram detectadas a partir de 15 dias após a 1ª imunização ($p < 0,001$) e 15 dias após a 2ª imunização ($p < 0,001$) mas, aumentou 15 e 30 dias após a 3ª imunização ($p < 0,001$).

Comparando-se pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G, os títulos de IgG e IgG2a detectados foram significativos 15 dias após a 1ª imunização ($p < 0,05$), 15 dias após a 2ª imunização ($p < 0,05$) e 15 e 30 dias após a 3ª imunização ($p < 0,001$). Os títulos de IgG1 anti-Hsp65 não diferiram, entre pCDNA3-hsp65 e

pCDNA3-hsp65G, 15 dias após a 1^a imunização e 15 dias após a 2^a imunização; esses títulos só foram diferentes 15 e 30 dias após a 1^a imunização.

Os níveis de anticorpos IgG1 anti-Hsp65 induzidos por pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G foram maiores que os de IgG2a, embora essa diferença tenha sido sutil.

As construções pCDNA3-N, pCDNA3-DS e pCDNA3-N59 não induziram títulos de anticorpos IgG, IgG1 ou IgG2a anti-Hsp65 diferentes significativamente dos controles (não imunizado e pCDNA3).

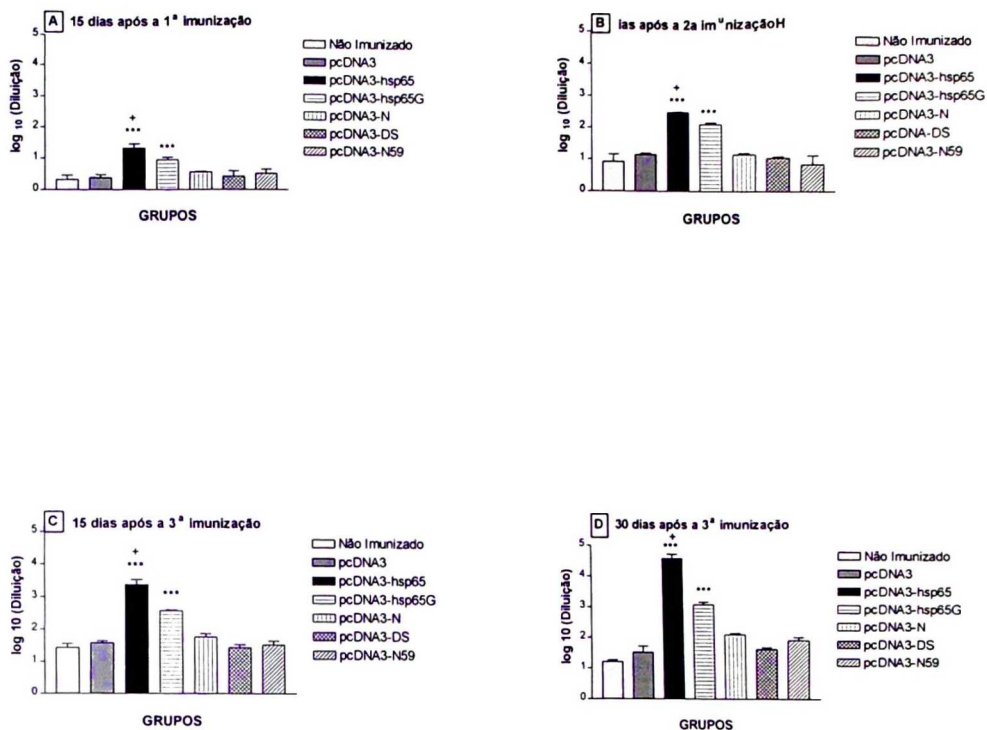


Figura 5 – Detecção de anticorpos IgG anti-Hsp65 após imunização com as construções de DNA por via intradérmica (Gene Gun). Os resultados apresentados nos gráficos foram subtraídos da densidade óptica detectada no soro T0 (pré-imune) e foram expressos como média e desvio padrão de IgG Hsp65-específica detectada no soro de 5 animais individuais. (***) $p < 0,001$ em relação aos controles (Não imunizado e pcDNA3). (+) $p < 0,05$ em relação a pcDNA3-hsp65G. Esses dados são representativos de 2 experimentos.

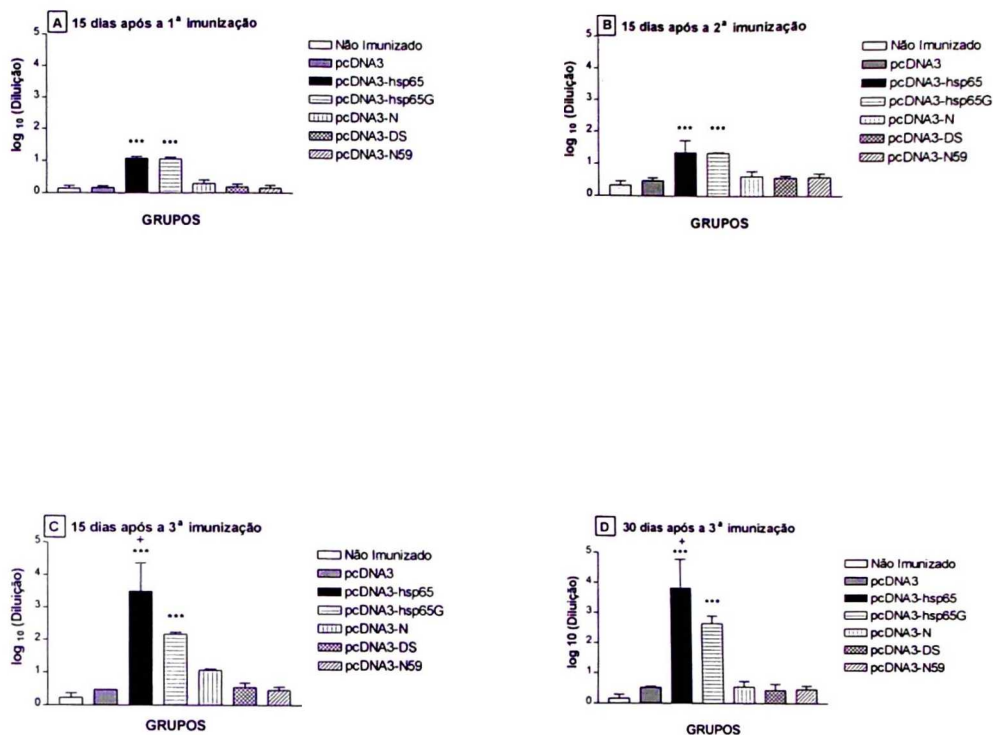


Figura 6 – Detecção de anticorpos IgG1 anti-Hsp65 após imunização com as construções de DNA por via intradérmica (Gene Gun). Os resultados apresentados nos gráficos foram subtraídos da densidade óptica detectada no soro T0 (pré-imune) e foram expressos como média e desvio padrão de IgG1 Hsp65-específica detectada no soro de 5 animais individuais. (***) $p < 0,001$ em relação aos controles (Não imunizado e pCDNA3). (+) $p < 0,05$ em relação a pCDNA3-hsp65G. Esses dados são representativos de 2 experimentos.

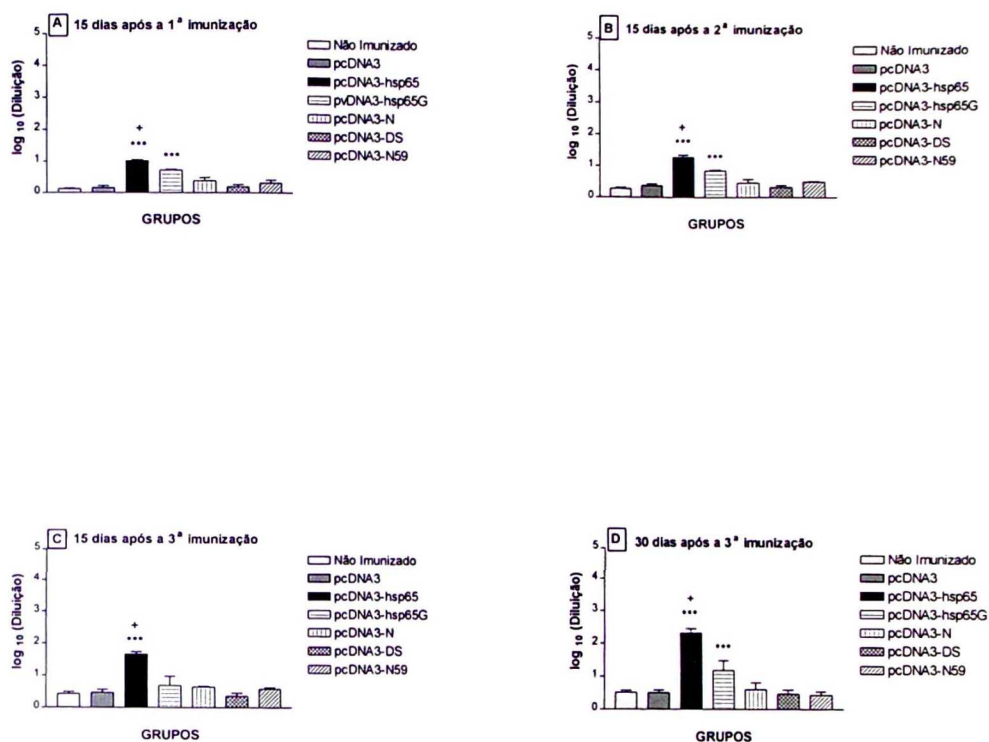


Figura 7 – Detecção de anticorpos IgG2a anti-Hsp65 após imunização com as construções de DNA por via intradérmica (Gene Gun). Os resultados apresentados nos gráficos foram subtraídos da densidade óptica detectada no soro T0 (pré-imune) e foram expressos como média e desvio padrão de IgG2a Hsp65-específica detectada no soro de 5 animais individuais. (***) $p < 0,001$ em relação aos controles (Não imunizado e pcDNA3). (*) $p < 0,05$ em relação a pcDNA3-hsp65G. Esses dados são representativos de 2 experimentos.

4.1.2- RESPOSTA IMUNE HUMORAL DOS ANIMAIS IMUNIZADOS POR VIA INTRAMUSCULAR:

Por via intramuscular, os títulos de anticorpos IgG anti-Hsp65 (Figura 8), IgG1 anti-Hsp65 (Figura 9) e IgG2a anti-Hsp65 (Figura 10) induzidos pela construção vacinal original pCDNA3-hsp65, pCDNA3-hsp65G e pCDNA3-N diferiram significativamente dos controles (não imunizado e pCDNA3). Não houve diferenças significativas entre a resposta de anticorpos induzida por pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G. Os níveis de anticorpos produzidos pelos animais imunizados com a construção pCDNA3-N foram menores que aqueles induzidos por pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G.

Os títulos de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a induzidos por pCDNA3-hsp65, pCDNA3-hsp65G e pCDNA3-N, em comparação aos controles, foram significativos a partir de 15 dias após a 1^a imunização ($p < 0,001$), mantiveram-se 15 dias após a 2^a imunização ($p < 0,001$) e aumentaram 15 e 30 dias após a 3^a imunização ($p < 0,001$). Em relação ao grupo imunizado com pCDNA3-N, os títulos de IgG induzidos por pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G foram significativos a partir de 15 dias após a 1^a imunização ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente), tendo aumentado 15 dias após a 2^a imunização e 15 e 30 dias após a 3^a imunização ($p < 0,001$). Os títulos de IgG1 foram diferentes estatisticamente 15 dias após a 1^a imunização ($p < 0,05$), mantiveram-se 15 dias após a 2^a imunização ($p < 0,05$) e aumentaram 15 e 30 dias após a imunização ($p < 0,001$). Os títulos de IgG2a também foram diferentes a partir de 15 dias após a 1^a imunização ($p < 0,001$) e aumentaram 15 dias após a 2^a imunização ($p < 0,001$)

e 15 e 30 dias após a 3^a imunização ($p < 0,001$). Já os títulos de IgG, IgG1 e IgG2a induzidos por pCDNA3-N só foram significativos 15 dias após a 2^a imunização, aumentando gradativamente até 30 dias após a 3^a imunização.

As construções pCDNA3-DS e pCDNA3-N59 não induziram resposta significativa de anticorpos em comparação com os controles.

De acordo com as figuras 9 e 10, os níveis de IgG2a detectados foram notavelmente maiores que os níveis de IgG1.

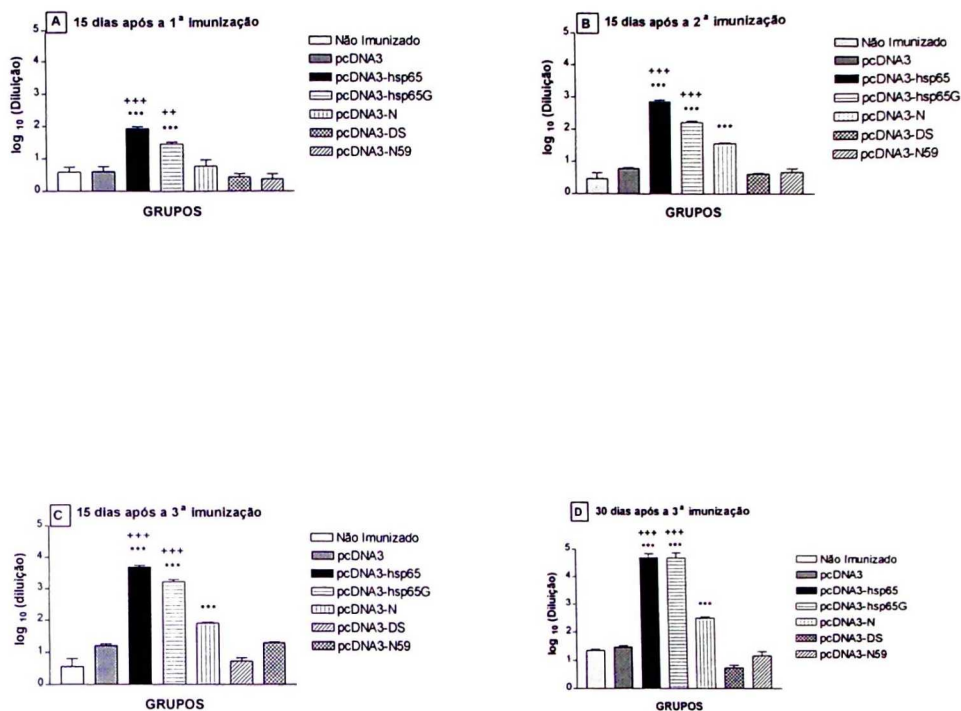


Figura 8 – Detecção de anticorpos IgG anti-Hsp65 após imunização com as construções de DNA por via intramuscular. Os resultados apresentados nos gráficos foram subtraídos da densidade óptica detectada no soro T0 (pré-imune) e foram expressos como média e desvio padrão de IgG Hsp65-específica detectada no soro de 5 animais individuais. (***) $p < 0,001$ em relação ao grupo não imunizado e ao grupo pcDNA3. (**) $p < 0,001$ em relação a pcDNA3-hsp65G. Esses dados são representativos de 2 experimentos.

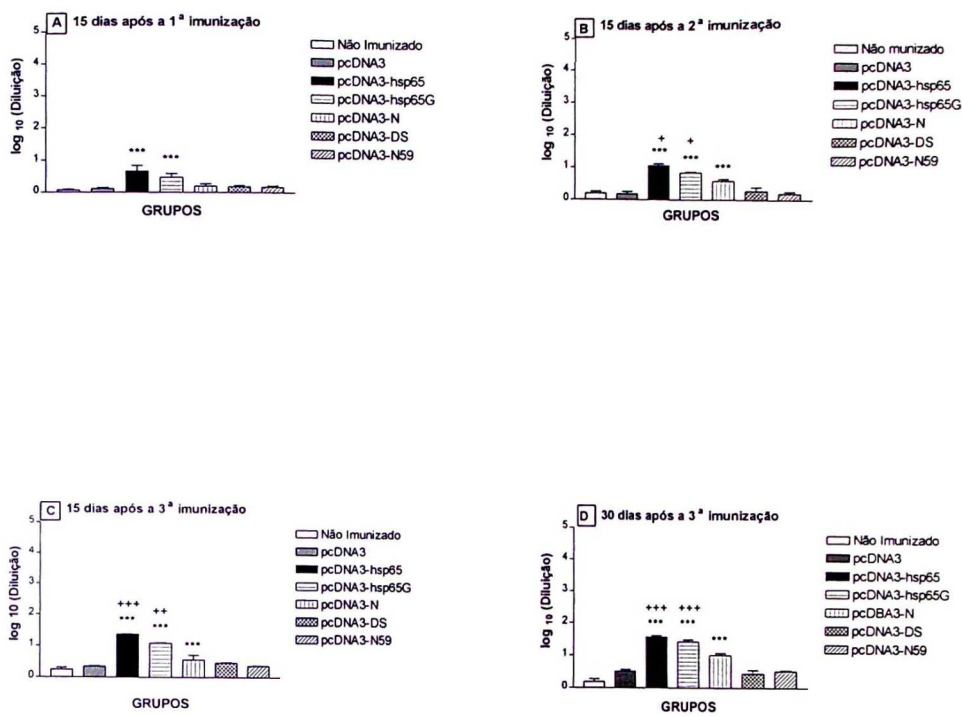


Figura 9 – Detecção de anticorpos IgG1 anti-Hsp65 após imunização com as construções de DNA por via intramuscular. Os resultados apresentados nos gráficos foram subtraídos da densidade óptica detectada no soro T0 (pré-imune) e foram expressos como média e desvio padrão de IgG1 Hsp65-específica detectada no soro de 5 animais individuais. (***) $p < 0,001$ em relação ao grupo não imunizado e ao grupo pCDNA3. (+) $p < 0,05$, (++) $p < 0,01$ e (+++) $p < 0,001$ em relação a pCDNA3-hsp65G. Esses dados são representativos de 2 experimentos.

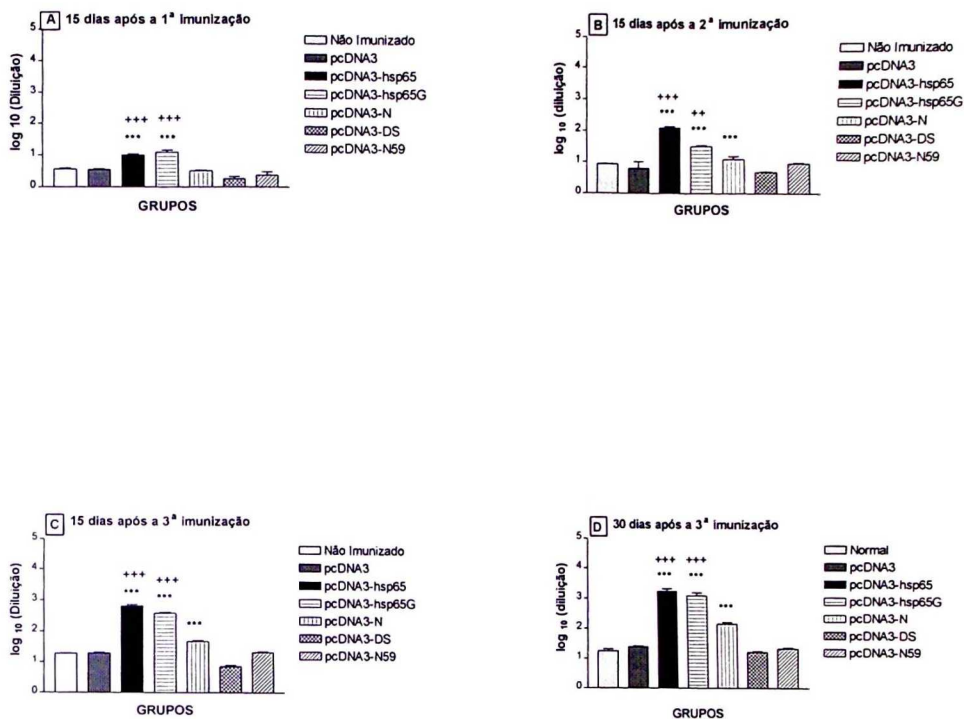


Figura 10 – Detecção de anticorpos IgG2a anti-Hsp65 após imunização com as construções de DNA por via intramuscular. Os resultados apresentados nos gráficos foram subtraídos da densidade óptica detectada no soro T0 (pré-imune) e foram expressos como média e desvio padrão de IgG2a Hsp65-específica detectada no soro de 5 animais individuais. (***) $p < 0,001$ em relação ao grupo não imunizado e ao grupo pcDNA3. (**) $p < 0,01$ e (+++) $p < 0,001$ em relação a pcDNA3-hsp65G. Esses dados são representativos de 2 experimentos.

4.2- RESPOSTA IMUNE CELULAR:

A resposta imune celular foi avaliada através de três parâmetros - proliferação de células totais do baço e dos linfonodos ingüinais, detecção dos níveis das citocinas IL-4, IL-10, IL-12 e IFN- γ e avaliação do aumento percentual de linfócitos B, T CD4+, T CD8+, macrófagos e células dendríticas no baço dos animais imunizados.

4.2.1- PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS:

O ensaio de proliferação celular foi realizado por incorporação de timidina triciada com células totais do baço e dos linfonodos ingüinais dos animais imunizados com as construções de DNA por via intradérmica (Gene Gun) e por via intramuscular. Os animais foram sacrificados 30 dias após a 3^a imunização e as células foram cultivadas na presença dos estímulos: ConA e proteína Hsp65 recombinante.

A) PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DOS ANIMAIS IMUNIZADOS COM AS CONSTRUÇÕES DE DNA POR VIA INTRADÉRMICA (GENE GUN):

Os dados referentes à proliferação de células totais do baço e dos linfonodos ingüinais dos animais imunizados por via intradérmica estão representados nas figuras 11 e 12, respectivamente. As células totais do baço e dos linfonodos ingüinais dos animais imunizados por via intradérmica com as construções de DNA proliferaram significativamente na presença de ConA ($p < 0,001$), em relação às células na ausência de estímulo (Meio). Quando estimuladas com Hsp65 recombinante, as células totais do baço e dos linfonodos ingüinais dos animais imunizados com a construção vacinal original pcDNA3-hsp65 e pcDNA3-hsp65G proliferaram mais que as células não estimuladas dos mesmos animais (Meio) ($p < 0,001$) e também proliferaram significativamente em relação às células dos animais dos grupos controles (pcDNA3 e Não imunizados) estimuladas com Hsp65 recombinante ($p < 0,001$). Entretanto, as células dos animais imunizados com a construção vacinal pcDNA3-hsp65 proliferaram mais que as células dos animais imunizados com pcDNA3-hsp65G ($p < 0,001$). As células do baço e linfonodos dos animais imunizados com as outras construções (pcDNA3-N, pcDNA3-DS e pcDNA3-N59) não proliferaram significativamente em comparação com as células não estimuladas destes mesmos animais nem em relação às células dos animais controles (pcDNA3 e Não Imunizados) estimuladas com Hsp65 ($p < 0,001$).

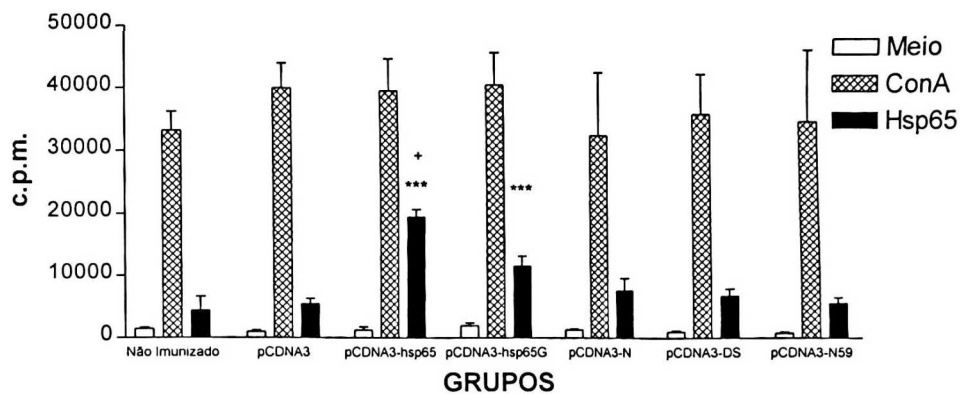


Figura 11 - Proliferação antígeno- específica de células totais do baço dos animais imunizados com as construções de DNA por via intradérmica (Gene Gun). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão da proliferação detectada na cultura de células do baço de 5 animais individuais. (***) $p < 0,001$ em relação aos controles e (+) $p < 0,05$ em relação a pCDNA3-hsp65G. Esses dados são representativos de 2 experimentos.

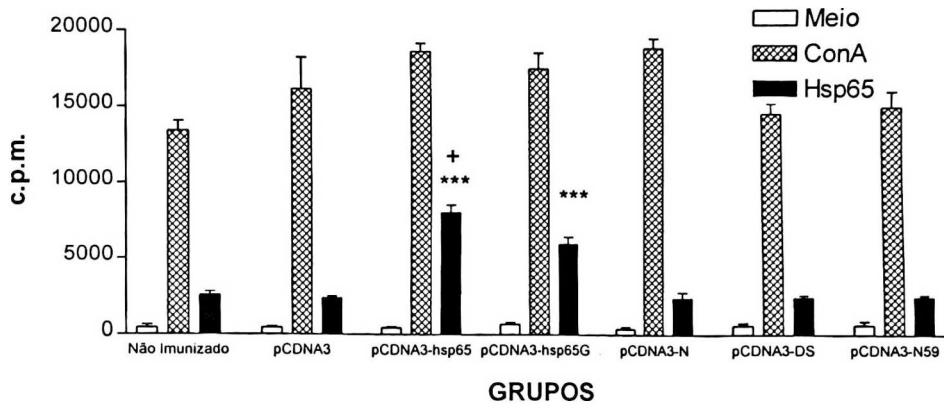


Figura 12 - Proliferação antígeno- específica do *pool* de células dos linfonodos inguinais dos animais imunizados com as construções de DNA por via intradérmica (Gene Gun). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão da proliferação detectada na cultura de células dos linfonodos ingüinais de 5 animais em triplicata. (***) $p < 0,001$ em relação aos controles e (+) $p < 0,05$ em relação a pCDNA3-hsp65G. Esses dados são representativos de 2 experimentos.

B) PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DOS ANIMAIS IMUNIZADOS COM AS CONSTRUÇÕES DE DNA POR VIA INTRAMUSCULAR:

Os resultados da proliferação de células totais do baço e linfonodos ingüinais dos animais imunizados com as construções de DNA por via intramuscular estão representados, respectivamente, nas figuras 13 e 14. As células totais do baço e linfonodos ingüinais dos animais imunizados, assim como dos animais dos grupos controle, proliferaram significativamente na presença de ConA em relação às células destes animais não estimuladas (Meio) ($p < 0,001$). As células dos animais imunizados com as construções de DNA pCDNA3-hsp65, pCDNA3-hsp65G e pCDNA3-N proliferaram significativamente na presença da Hsp65 recombinante em relação às células não estimuladas destes mesmos animais, bem como em comparação com as células dos animais dos grupos controle (pCDNA3 e Não Imunizados) ($p < 0,001$). A proliferação de células totais do baço e dos linfonodos ingüinais mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa na proliferação das células dos animais imunizados com a construção vacinal pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G. Em contrapartida, diferenças foram observadas comparando as células dos animais imunizados com a construção vacinal pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-N ($p < 0,001$) e comparando as construções pCDNA3-hsp65G e pCDNA3-N ($p < 0,001$). Os grupos de animais imunizados com pCDNA3-DS e pCDNA3-N59 não apresentaram proliferação diferente estatisticamente do índice dos animais dos grupos controle ($p > 0,05$).

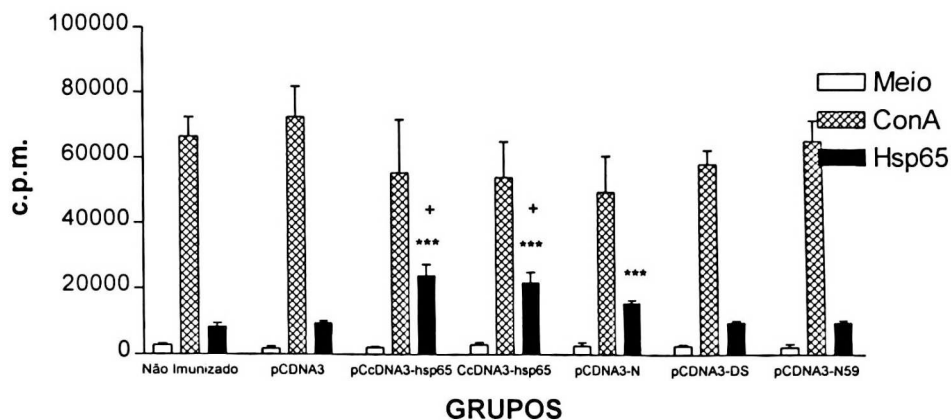


Figura 13 - Proliferação antígeno- específica de células totais do baço dos animais imunizados por via intramuscular com construções de DNA. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão da proliferação detectada na cultura do baço de 5 animais individuais. (***) $p < 0,001$ em relação aos controles e (+) $p < 0,05$ em relação a pCDNA3-N. Esses dados são representativos de 2 experimentos.

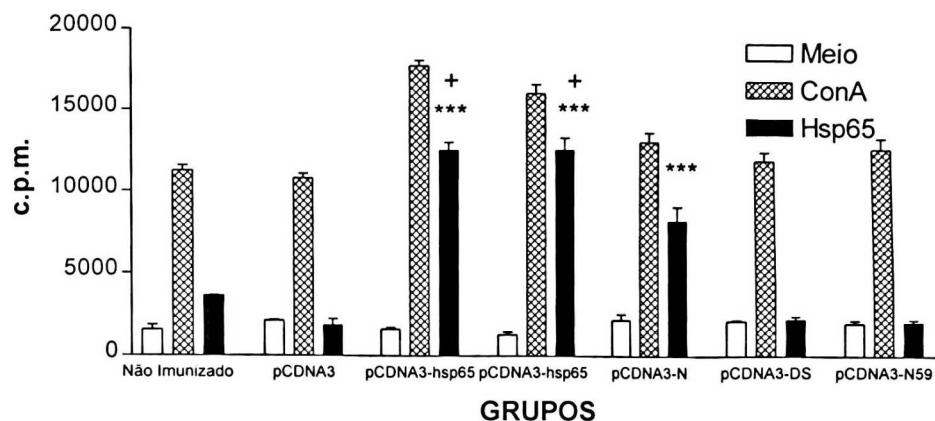


Figura 14 - Proliferação antígeno- específica do *pool* de células dos linfonodos ingüinais dos animais imunizados por via intramuscular com construções de DNA. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão da proliferação detectada na cultura de células dos linfonodos ingüinais de 5 animais em triplicata. (***) $p < 0,001$ em relação aos controles e (+) $p < 0,05$ em relação a pCDNA3-N. Esses dados são representativos de 2 experimentos.

4.2.2- DETECÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS:

Os níveis de citocinas foram avaliados, através do ensaio imunoenzimático ELISA, no sobrenadante de cultura de células totais do baço e dos linfonodos ingüinais dos animais imunizados com as construções de DNA por via intradérmica (Gene Gun) ou via intramuscular. Os animais foram sacrificados 30 dias após a 3ª imunização e as células foram cultivadas na presença dos estímulos ConA, *Staphylococcus aureus* Cowan I e Hsp65.

A) DETECÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS DOS ANIMAIS IMUNIZADOS POR VIA INTRADÉRMICA (GENE GUN):

Por via intradérmica (Gene Gun), as células totais do baço (Figuras 15, 17, 19 e 20) e linfonodos inguiniais (Figuras 16, 18, 20 e 22) dos animais imunizados com as construções de DNA produziram elevadas quantidades de IL-4, IL-10, IFN- γ e IL-12 na presença ConA e de *S. aureus* Cowan I em relação às células não estimuladas destes animais (Meio). Na presença de Hsp65 recombinante, a produção dessas citocinas pelas células dos animais imunizados com pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G foi significativa, quando comparada com a produção pelas células não estimuladas dos animais destes mesmos grupos (Meio) ($p < 0,001$) e quando comparada a produção pelas células dos animais dos grupos controle (pCDNA3 e Não Imunizados) estimuladas com Hsp65 ($p < 0,001$). A produção de IL-4 foi demasiadamente baixa com média dos valores de 32,88

pg/mL e 18,94 pg/mL para as células do baço e 23,24 pg/mL e 16,10 pg/mL. Os animais imunizados com pCDNA3-N, pCDNA3-DS e pCDNA3-N59 não produziram níveis de IL-4, IL-10, IFN- γ , IL-12 estatisticamente significativos em relação às células não estimuladas destes animais (Meio) ($p < 0,001$) e em relação às células dos animais dos grupos controle (pCDNA3 e Não Imunizados) estimuladas com Hsp65 ($p < 0,001$).

Os níveis de citocinas Th2 (IL-4 e IL-10) são maiores que os níveis de citocinas Th1 (IFN- γ e IL-12), entretanto, não são expressivamente diferentes.

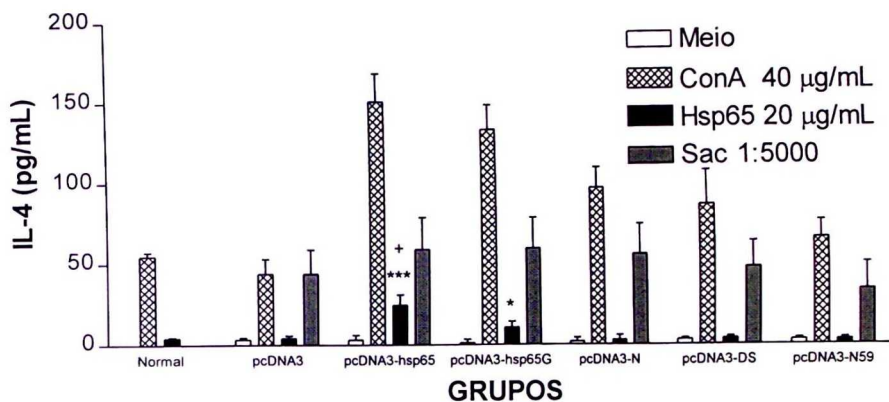


Figura 15 – Detecção dos níveis de IL-4 no sobrenadante de células totais do baço de animais imunizados com as construções de DNA por via intradérmica (Gene Gun). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão de IL-4 detectada no sobrenadante das células de 5 animais individuais. (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$ em relação aos controles (Não Imunizado e pcDNA3). (+) $p < 0,05$ em relação a pcDNA3-hsp65G. A produção de IL-4 foi comparada nas células estimuladas dos animais imunizados em relação às células não estimuladas desses animais (Meio) e em relação à produção dessa citocina pelas células estimuladas dos animais controles. Esses dados são representativos de 2 experimentos.

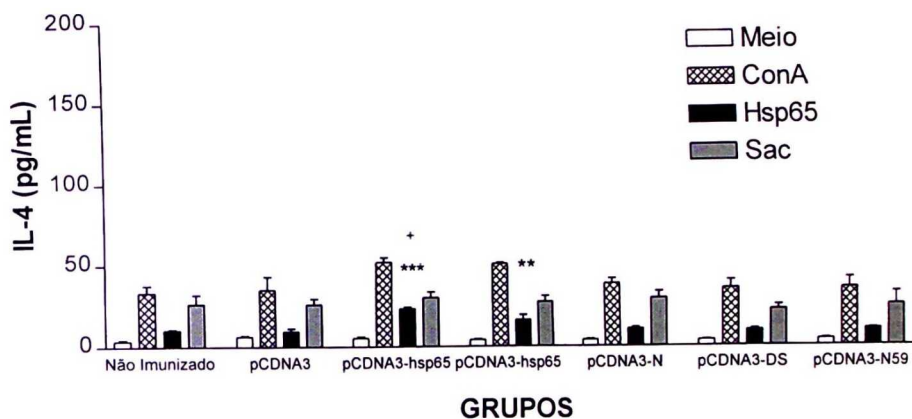


Figura 15 – Detecção dos níveis de IL-4 no sobrenadante de *pool* de células de linfonodos inguinais de animais imunizados com as construções de DNA por via intradérmica (Gene Gun). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão de IL-4 detectada no sobrenadante do *pool* de células de 5 animais em triplicatas. (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$ em relação aos grupos controles (Não Imunizado e pCDNA3). (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo pCDNA3-hsp65G. A produção de IL-4 foi comparada nas células estimuladas dos animais imunizados em relação às células não estimuladas desses animais (Meio) e em relação à produção dessa citocina pelas células estimuladas dos animais controles. Esses dados são representativos de 2 experimentos.

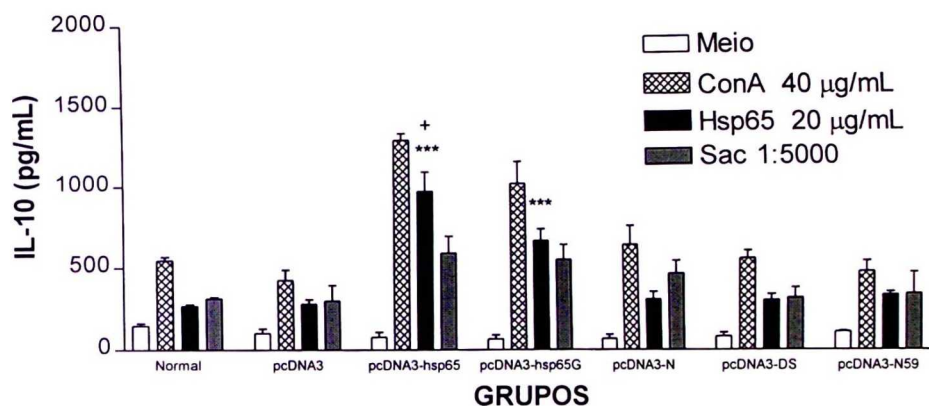


Figura 16 – Detecção dos níveis de IL-10 no sobrenadante de células totais do baço de animais imunizados com as construções de DNA por via intradérmica (Gene Gun). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão de IL-10 detectada no sobrenadante das células de 5 animais individuais. (***) $p < 0,001$ em relação aos grupos controles e (+) $p < 0,05$ em relação ao grupo pcDNA3-hsp65G. A produção de IL-10 foi comparada nas células estimuladas dos animais imunizados em relação às células não estimuladas desses animais (Meio) e em relação à produção dessa citocina pelas células estimuladas dos animais controles (Não imunizado e pcDNA3). Esses dados são representativos de 2 experimentos.

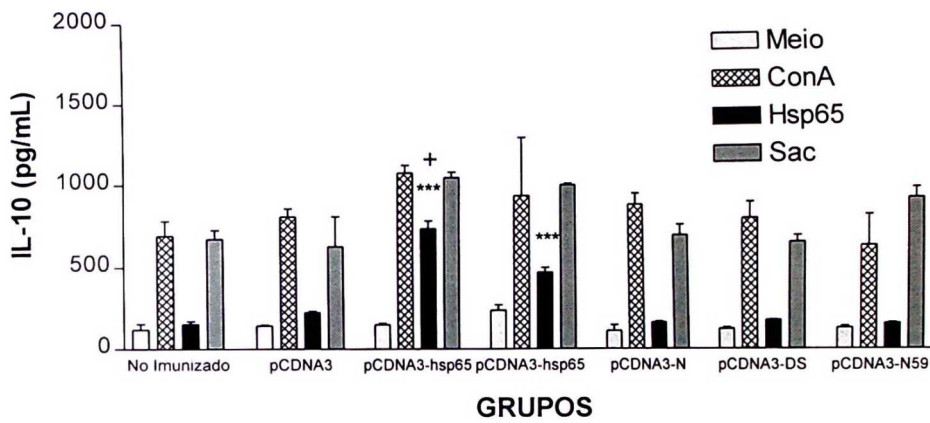


Figura 17 – Detecção dos níveis de IL-10 no sobrenadante de *pool* de células de linfonodos inguinais de animais imunizados com as construções de DNA por via intradérmica (Gene Gun). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão de IL-10 detectada no sobrenadante do *pool* de células de 5 animais em triplicatas. (***) $p < 0,001$ em relação aos grupos controles (Não Imunizado e pCDNA3). (+) $p < 0,05$ em relação ao grupo pCDNA3-hsp65G. A produção de IL-10 foi comparada nas células estimuladas dos animais imunizados em relação às células não estimuladas desses animais (Meio) e em relação à produção dessa citocina pelas células estimuladas dos animais controles (Não imunizado e pCDNA3). Esses dados são representativos de 2 experimentos.

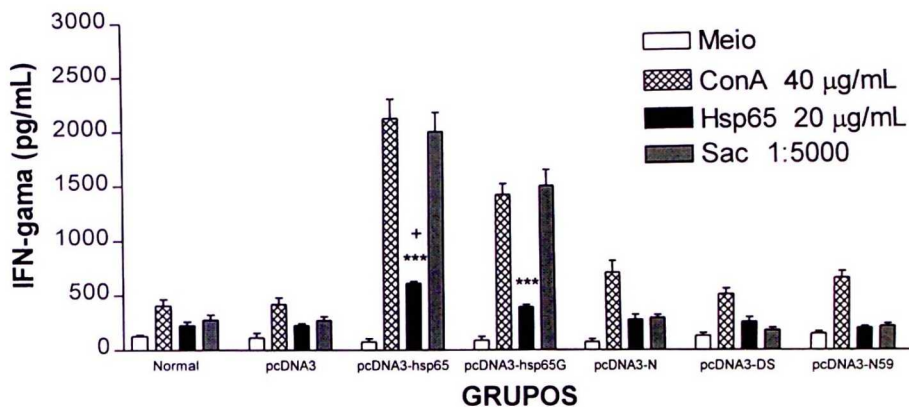


Figura 19 - Detecção dos níveis de IFN- γ no sobrenadante de células totais do baço de animais imunizados com as construções de DNA por via intradérmica (Gene Gun). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão de IFN- γ detectada no sobrenadante das células de 5 animais individuais. (***) $p < 0,001$ em relação aos grupos controles (Não Imunizado e pCDNA3) e (+) $p < 0,05$ em relação ao grupo pCDNA3-hsp65G. A produção de IFN- γ foi comparada nas células estimuladas dos animais imunizados em relação às células não estimuladas desses animais (Meio) e em relação à produção dessa citocina pelas células estimuladas dos animais controles (Não imunizado e pCDNA3). Esses dados são representativos de 2 experimentos.

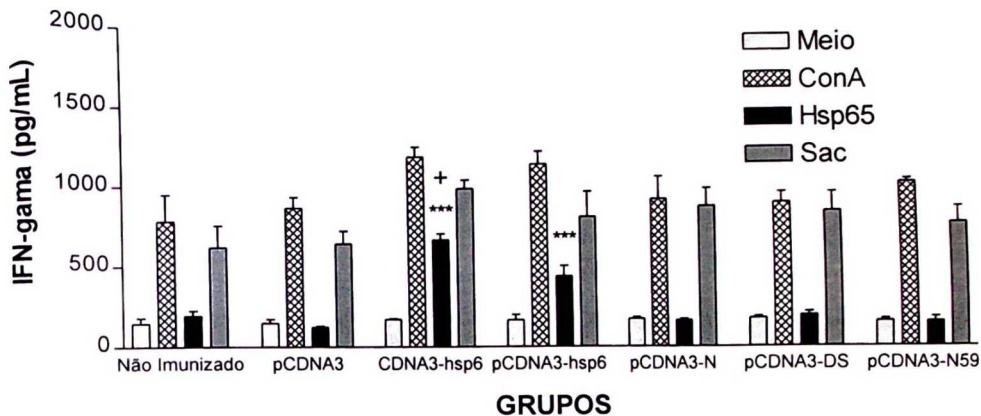


Figura 20 – Detecção dos níveis de IFN- γ no sobrenadante do *pool* de células de linfonodos inguinais de animais imunizados com as construções de DNA por via intradérmica (Gene Gun). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão de IFN- γ detectada no sobrenadante do *pool* de células de 5 animais em triplicatas. (***) $p < 0,001$ em relação aos grupos controles (Não Imunizado e pCDNA3) e (+) $p < 0,05$ em relação ao grupo pCDNA3-hsp65G. A produção de IFN- γ foi comparada nas células estimuladas dos animais imunizados em relação às células não estimuladas desses animais (Meio) e em relação à produção dessa citocina pelas células estimuladas dos animais controles (Não imunizado e pCDNA3). Esses dados são representativos de 2 experimentos.

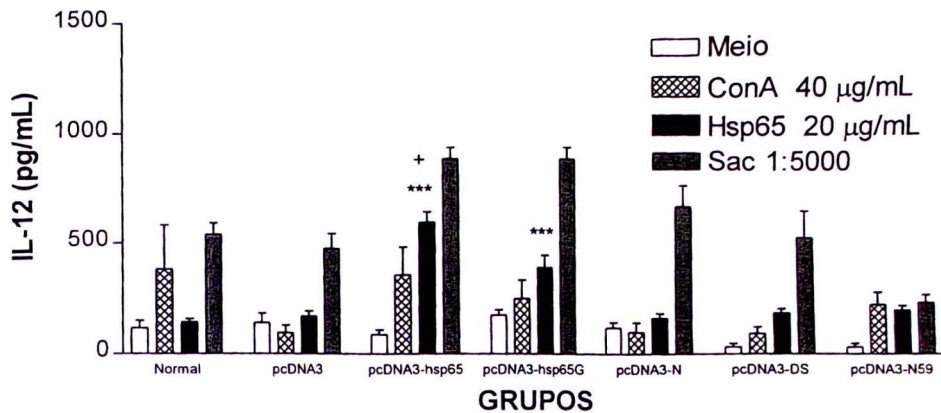


Figura 21 - Detecção dos níveis de IL-12 no sobrenadante de células totais do baço de animais imunizados com as construções de DNA por via intradérmica (Gene Gun). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão de IL-12 detectada no sobrenadante das células de 5 animais individuais. (***) $p < 0,001$ em relação aos grupos controles (Não Imunizado e pcDNA3) e (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo pcDNA3-hsp65G. A produção de IL-12 foi comparada nas células estimuladas dos animais imunizados em relação às células não estimuladas desses animais (Meio) e em relação à produção dessa citocina pelas células estimuladas dos animais controles (Não imunizado e pcDNA3). Esses dados são representativos de 2 experimentos.

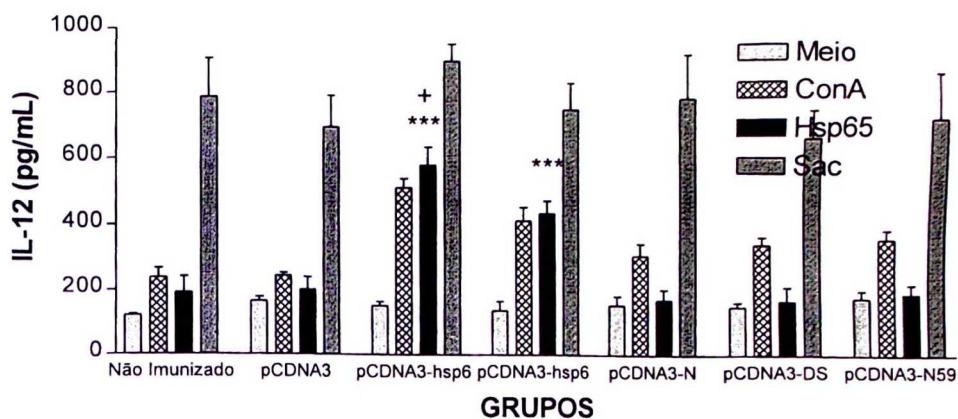


Figura 22 – Detecção dos níveis de IL-12 no sobrenadante de *pool* de células de linfonodos inguinais de animais imunizados com as construções de DNA por via intradérmica (Gene Gun). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão de IL-12 detectada no sobrenadante do *pool* de células de 5 animais em triplicatas. (***) $p < 0,001$ em relação aos grupos controles (Não Imunizado e pCDNA3) e (+) $p < 0,05$ em relação ao grupo pCDNA3-hsp65G. A produção de IL-12 foi comparada nas células estimuladas dos animais imunizados em relação às células não estimuladas desses animais (Meio) e em relação à produção dessa citocina pelas células estimuladas dos animais controles (Não imunizado e pCDNA3). Esses dados são representativos de 2 experimentos.

B) DETECÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS DOS ANIMAIS IMUNIZADOS POR VIA INTRAMUSCULAR:

As células totais do baço (Figura 23, 25, 27 e 29) e linfonodos ingüinais (Figura 24, 26, 28 e 30) dos animais imunizados com as construções de DNA por via intramuscular produziram quantidades elevadas de IL-4, IL-10, IFN- γ e IL-12 em resposta à estimulação com ConA e *S. aureus* Cowan I em relação às células não estimuladas dos animais ($p < 0,001$) e às células dos animais controle (pCDNA3 e Não imunizado) ($p < 0,001$). Em resposta à Hsp65 recombinante, as células dos animais imunizados com a vacina pcDNA3-hsp65, pcDNA3-hsp65G e pcDNA3-N produziram níveis significativos de IL-4, IL-10, IFN- γ e IL-12 em comparação com as células não estimuladas destes animais (Meio) ($p < 0,001$) e em relação às células dos animais controle (pCDNA3 e Não Imunizado) ($p < 0,001$).

Contudo, a produção dessas citocinas pelos animais imunizados com a construção vacinal original pcDNA3-hsp65 não foi diferente estatisticamente da produção pelos animais imunizados com pcDNA3-hsp65G. Já os animais imunizados com pCDNA3-N produziram menor quantidade de citocinas em comparação com os animais imunizados com pCDNA3-hsp65 ($p < 0,001$) e pCDNA3-hsp65G ($p < 0,001$).

As construções pCDNA3-DS e pCDNA3-N59 não induziram produção de citocinas nos animais imunizados quando se comparou com a produção de

citocinas pelas células não estimuladas (Meio) ($p < 0,001$) e com a produção pelos animais dos grupos controles (pCDNA3 e Não Imunizado) ($p < 0,001$).

Os níveis de citocinas Th1 (IFN-gama e IL-12) foram visivelmente mais elevados que os níveis de citocinas Th2 (IL-4 e IL-10).

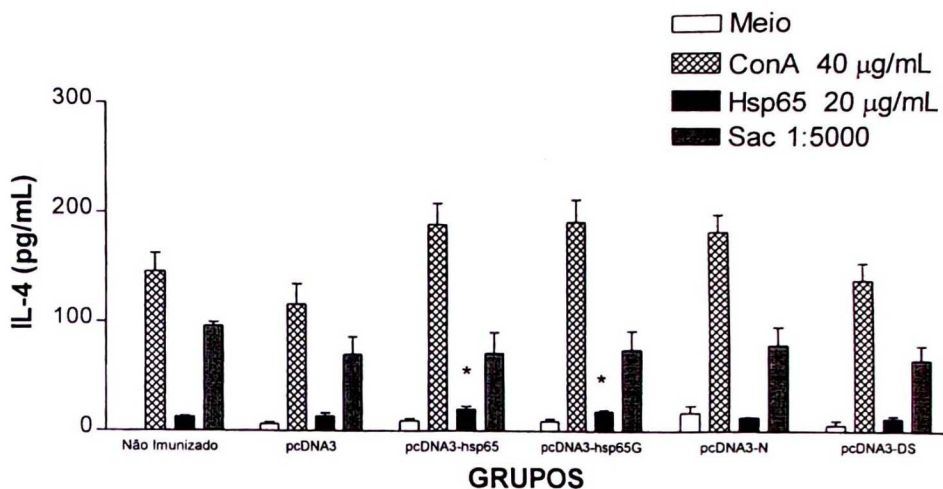


Figura 23 – Detecção dos níveis de IL-4 no sobrenadante de células totais do baço de animais imunizados com as construções de DNA por via intramuscular. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão de IL-4 detectada no sobrenadante das células de 5 animais individuais. (*) $p < 0,05$ em relação aos controles (Não Imunizado e pcDNA3). A produção de IL-4 foi comparada nas células estimuladas dos animais imunizados em relação às células não estimuladas desses animais (Meio) e em relação à produção dessa citocina pelas células estimuladas dos animais controles (Não imunizado e pcDNA3). Esses dados são representativos de 2 experimentos.

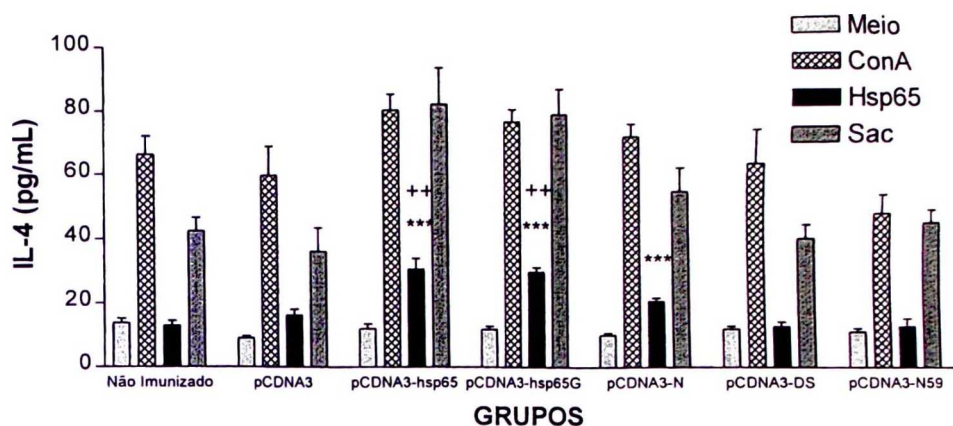


Figura 24 – Detecção dos níveis de IL-4 no sobrenadante do *pool* de células dos linfonodos inguinais de animais imunizados com as construções de DNA por via intramuscular. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão de IL-4 detectada no sobrenadante do *pool* de células de 5 animais em triplicatas. (***) $p < 0,001$ em relação aos grupos controles (Não Imunizado e pCDNA3). (++) $p < 0,01$ em relação ao grupo pCDNA3-hsp65G. A produção de IL-4 foi comparada nas células estimuladas dos animais imunizados em relação às células não estimuladas desses animais (Meio) e em relação à produção dessa citocina pelas células estimuladas dos animais controles (Não imunizado e pCDNA3). Esses dados são representativos de 2 experimentos.

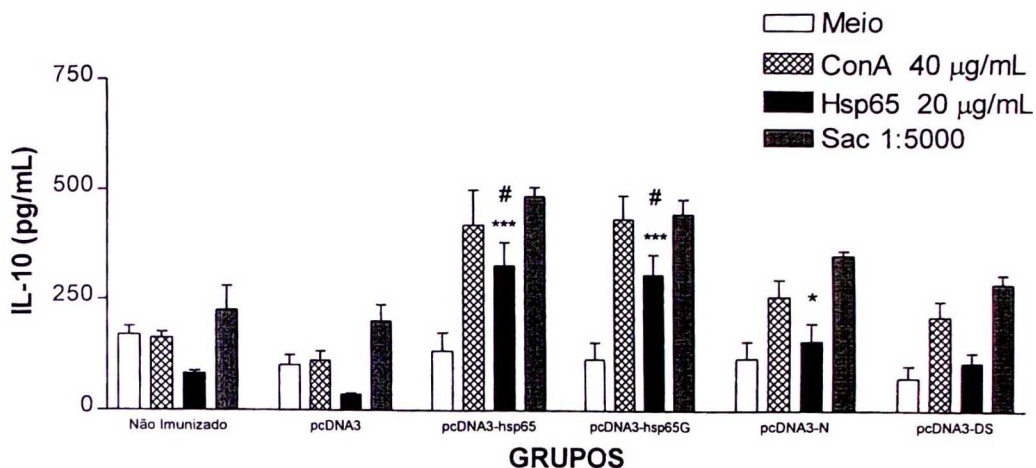


Figura 25 – Detecção dos níveis de IL-10 no sobrenadante de células totais do baço de animais imunizados com as construções de DNA por via intramuscular. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão de IL-10 detectada no sobrenadante das células de 5 animais individuais. (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$ em relação aos grupos controles (Não Imunizado e pcDNA3) e (++) $p < 0,01$ em relação ao grupo pcDNA3-hsp65G. A produção de IL-10 foi comparada nas células estimuladas dos animais imunizados em relação às células não estimuladas desses animais (Meio) e em relação à produção dessa citocina pelas células estimuladas dos animais controles (Não imunizado e pcDNA3). Esses dados são representativos de 2 experimentos.

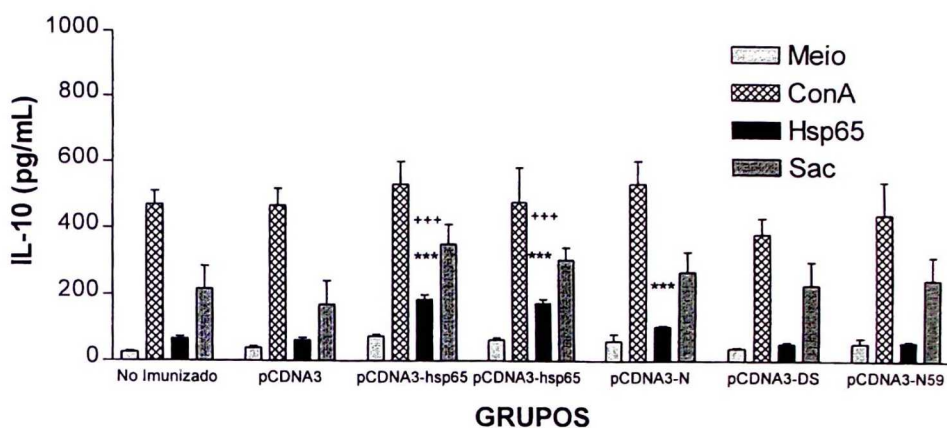


Figura 26 – Detecção dos níveis de IL-10 no sobrenadante do *pool* de células dos linfonodos inguinais de animais imunizados com as construções de DNA por via intramuscular. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão de IL-10 detectada no sobrenadante do *pool* de células de 5 animais em triplicatas. (***) $p < 0,001$ em relação aos grupos controles (Não Imunizado e pCDNA3) e (+++) $p < 0,001$ em relação ao grupo pCDNA3-hsp65G. A produção de IL-10 foi comparada nas células estimuladas dos animais imunizados em relação às células não estimuladas desses animais (Meio) e em relação à produção dessa citocina pelas células estimuladas dos animais controles (Não imunizado e pCDNA3). Esses dados são representativos de 2 experimentos.

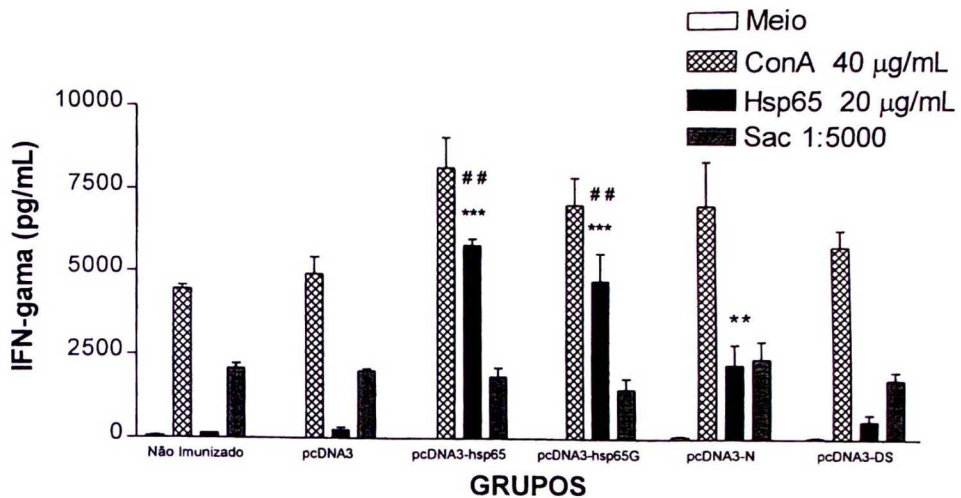


Figura 27 – Detecção dos níveis de IFN- γ no sobrenadante de células totais do baço de animais imunizados com as construções de DNA por via intradérmica (Gene Gun). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão de IFN- γ detectada no sobrenadante das células de 5 animais individuais. (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$ em relação aos grupos controles (Não Imunizado e pCDNA3) e (++) $p < 0,01$ em relação ao grupo pCDNA3-hsp65G. A produção de IFN- γ foi comparada nas células estimuladas dos animais imunizados em relação às células não estimuladas desses animais (Meio) e em relação à produção dessa citocina pelas células estimuladas dos animais controles (Não imunizado e pCDNA3). Esses dados são representativos de 2 experimentos.

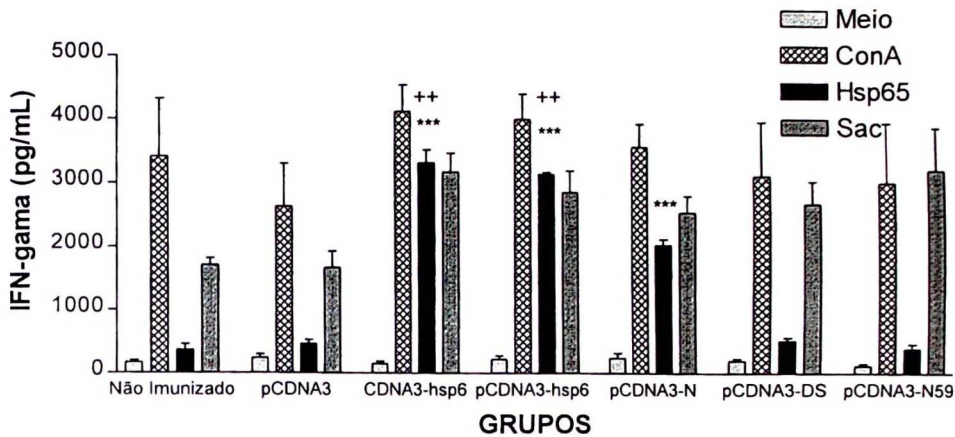


Figura 28 – Detecção dos níveis de IFN- γ no sobrenadante do *pool* de células dos linfonodos inguinais de animais imunizados com as construções de DNA por via intramuscular. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão de IFN- γ detectada no sobrenadante do *pool* de células de 5 animais. (***) $p < 0,001$ em relação aos grupos controles (Não Imunizado e pCDNA3). (**) $p < 0,01$ em relação ao grupo pCDNA3-hsp65G. A produção de IFN- γ foi comparada nas células estimuladas dos animais imunizados em relação às células não estimuladas desses animais (Meio) e em relação à produção dessa citocina pelas células estimuladas dos animais controles (Não imunizado e pCDNA3). Esses dados são representativos de 2 experimentos.

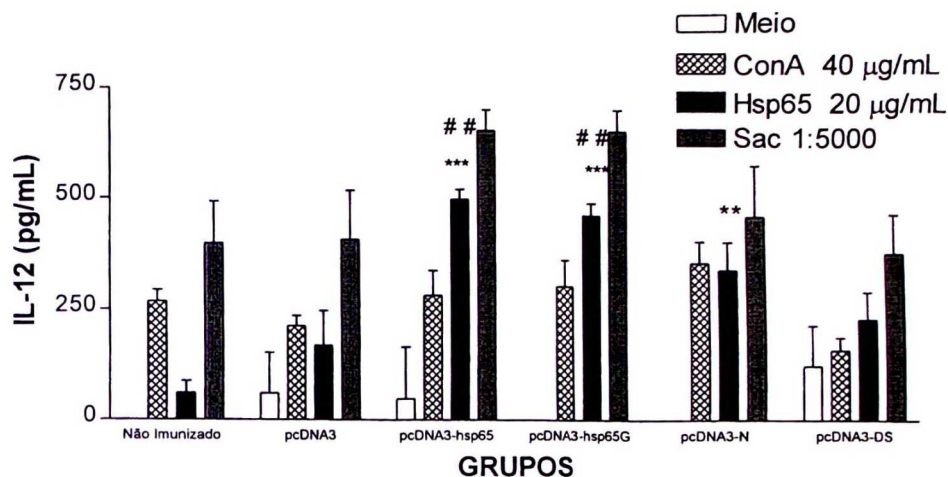


Figura 29 – Detecção dos níveis de IL-12 no sobrenadante de células totais do baço de animais imunizados com as construções de DNA por via intradérmica (Gene Gun). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão de IL-12 detectada no sobrenadante das células de 5 animais individuais. (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$ em relação aos grupos controles (Não Imunizado e pCDNA3) e (**) $p < 0,01$ em relação ao grupo pCDNA3-hsp65G. A produção de IL-12 foi comparada nas células estimuladas dos animais imunizados em relação às células não estimuladas desses animais (Meio) e em relação à produção dessa citocina pelas células estimuladas dos animais controles (Não imunizado e pCDNA3). Esses dados são representativos de 2 experimentos.

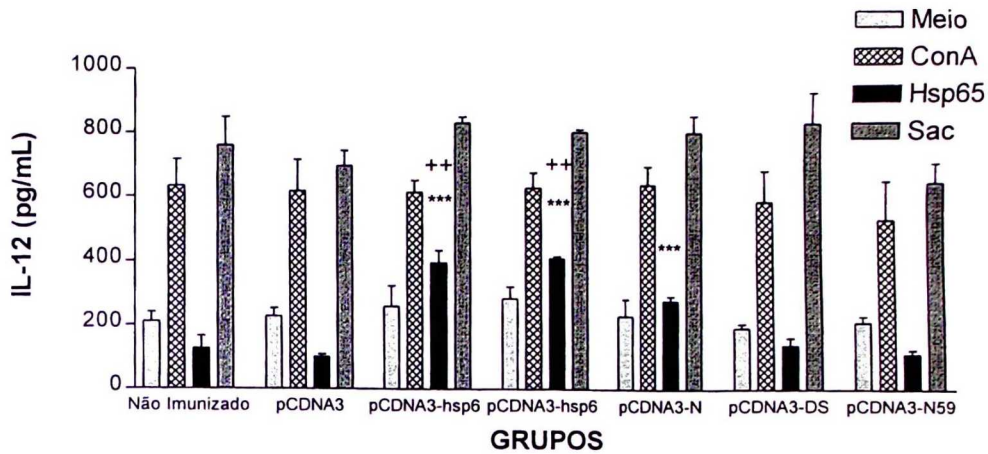


Figura 30 – Detecção dos níveis de IL-12 no sobrenadante do *pool* de células dos linfonodos inguinais de animais imunizados com as construções de DNA por via intramuscular. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão de IL-12 detectada no sobrenadante do *pool* de células de 5 animais em triplicatas. (***) $p < 0,001$ em relação aos grupos controles (Não Imunizado e pCDNA3). (**) $p < 0,01$ em relação ao grupo pCDNA3-hsp65G. A produção de IL-12 foi comparada nas células estimuladas dos animais imunizados em relação às células não estimuladas desses animais (Meio) e em relação à produção dessa citocina pelas células estimuladas dos animais controles (Não imunizado e pCDNA3). Esses dados são representativos de 2 experimentos.

4.2.3- AVALIAÇÃO DO INFLUXO DE SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS PARA O BAÇO DOS ANIMAIS IMUNIZADOS:

A) INFLUXO DE SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS PARA O BAÇO DOS ANIMAIS IMUNIZADOS COM AS CONSTRUÇÕES DE DNA POR VIA INTRADÉRMICA (GENE GUN):

A avaliação do influxo de células para o baço dos animais imunizados com as construções de DNA por via intradérmica foi realizada nos grupos de animais imunizados com a construção vacinal pCDNA3-hsp65 e pcDNA3-hsp65G por terem sido as construções que induziram resposta imune humoral e celular significativa em relação aos grupos controles (Não Imunizado e pCDNA3) e aos demais grupos. Apesar de não terem induzido resposta imune significativa, os animais imunizados com pCDNA3-N também foram analisados para que os resultados pudessem ser comparados posteriormente com os dos animais imunizados com essa construção de DNA por via intramuscular. O aumento do influxo de células para o baço dos animais imunizados foi investigado 30 dias após a 3^a imunização, de acordo com protocolo experimental descrito em Material e Métodos.

O aumento percentual de linfócitos B foi avaliado pelo aumento de células CD19+ no baço dos animais imunizados. Os animais imunizados com pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G apresentaram aumento percentual de linfócitos B em relação aos grupos controles (Não imunizado e pCDNA3), de acordo com a figura 30 e tabela 2. Um aumento percentual significativo de células

verificado no baço dos animais imunizados com a construção vacinal original pCDNA3-hsp65 em comparação com pCDNA3-hsp65G.

Houve um aumento percentual significativo de linfócitos T (Figura 32) no baço dos animais imunizados com a construção vacinal pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G, em relação aos controles (Não imunizado e pCDNA3). Entretanto, o aumento percentual de linfócitos T no baço dos animais imunizados com a construção vacinal pCDNA3-hsp65 foi maior que aquele dos animais imunizados com pCDNA3-hsp65G.

Dentre os linfócitos T, o aumento das populações de linfócitos T CD4⁺ (Figura 33) e CD8⁺ (Figura 34) também foi avaliado. As células T CD4⁺ e CD8⁺ aumentaram significativamente nos grupos imunizados com pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G em relação aos grupos controles (Não Imunizado e pCDNA3). Foram verificadas diferenças significativas no percentual de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ nos animais imunizados com pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G.

As populações de macrófagos (Figura 35) e de células dendríticas (Figura 36) foram expandidas significativamente no baço dos animais imunizados com pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G, com relação aos grupos controle (Não Imunizado e pCDNA3). O aumento percentual de macrófagos e células dendríticas no baço dos animais dos grupos pCDNA3-hsp65 foi maior que o do grupo pCDNA3-hsp65G.

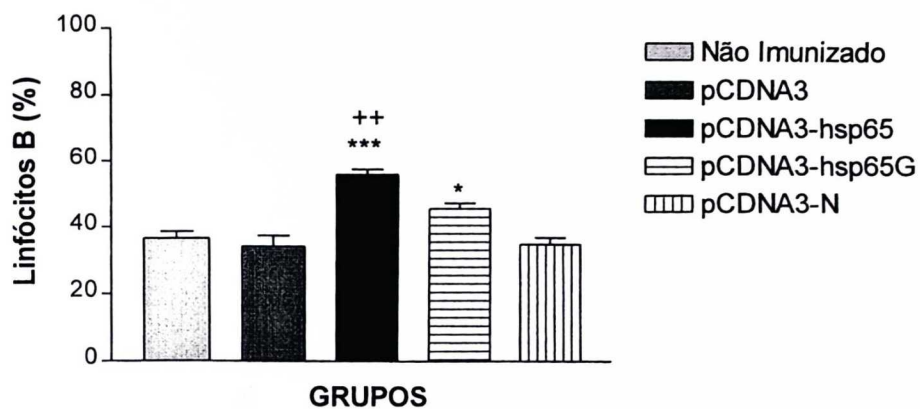


Figura 31 - Percentual de linfócitos B no baço dos animais imunizados com as construções por via intradérmica (Gene Gun). Células apresentando CD19 foram consideradas linfócitos B. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão do percentual de linfócitos B das células totais do baço de 5 animais individuais. (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$ em relação aos grupos controles (Não Imunizado e pCDNA3). (++) $p < 0,05$ em relação aos grupos pCDNA3-hsp65G e pCDNA3-N. Esses dados são representativos de 2 experimentos.

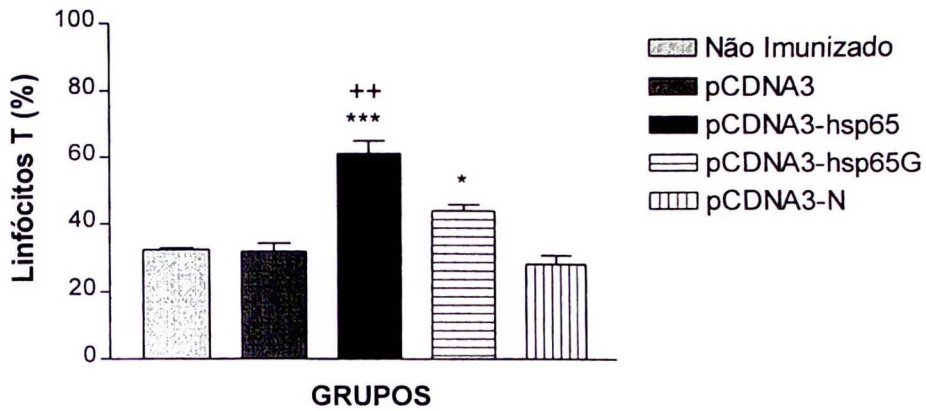


Figura 32 - Percentual de linfócitos T no baço dos animais imunizados com as construções por via intradérmica (Gene Gun). Células apresentando CD3 foram consideradas linfócitos T. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão do percentual de linfócitos T das células totais do baço de 5 animais individuais. (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$ em relação aos grupos controles (Não Imunizado e pCDNA3). (++) $p < 0,01$ em relação aos grupos pCDNA3-hsp65G e pCDNA3-N. Esses dados são representativos de 2 experimentos.

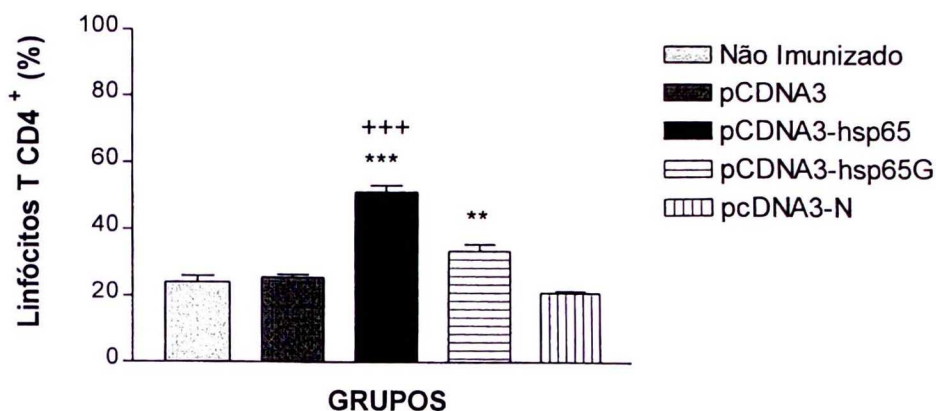


Figura 33 - Percentual de linfócitos T CD4⁺ no baço dos animais imunizados com as construções por via intradérmica (Gene Gun). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão do percentual de linfócitos T CD4⁺ das células totais do baço de 5 animais individuais. (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$ em relação aos grupos controles (Não Imunizado e pCDNA3). (+++) $p < 0,001$ em relação aos grupos pCDNA3-hsp65G e pCDNA3-N. Esses dados são representativos de 2 experimentos.

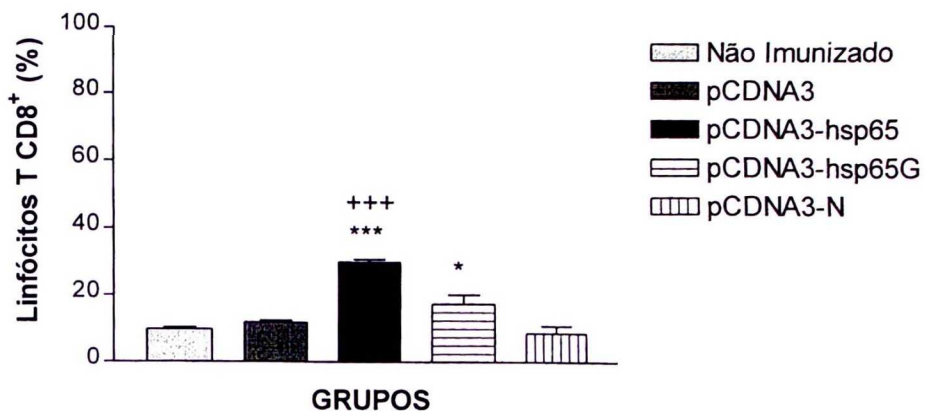


Figura 34 - Percentual de linfócitos T CD8⁺ no baço dos animais imunizados com as construções por via intradérmica (Gene Gun). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão do percentual de linfócitos T CD8⁺ das células totais do baço de 5 animais individuais. (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$ em relação aos grupos controles (Não Imunizado e pCDNA3). (++) $p < 0,05$ em relação aos grupos pCDNA3-hsp65G e pCDNA3-N. Esses dados são representativos de 2 experimentos.

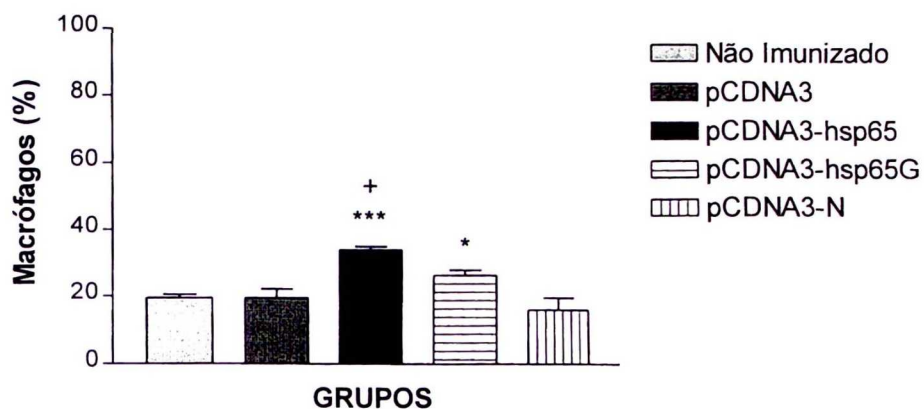


Figura 35 - Percentual de macrófagos no baço dos animais imunizados com as construções por via intradérmica (Gene Gun). Células apresentando CD11b foram consideradas macrófagos. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão do percentual de macrófagos das células totais do baço de 5 animais individuais. (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$ em relação aos grupos controles (Não Imunizado e pCDNA3). (+) $p < 0,05$ em relação aos grupos pCDNA3-hsp65G e pCDNA3-N. Esses dados são representativos de 2 experimentos.

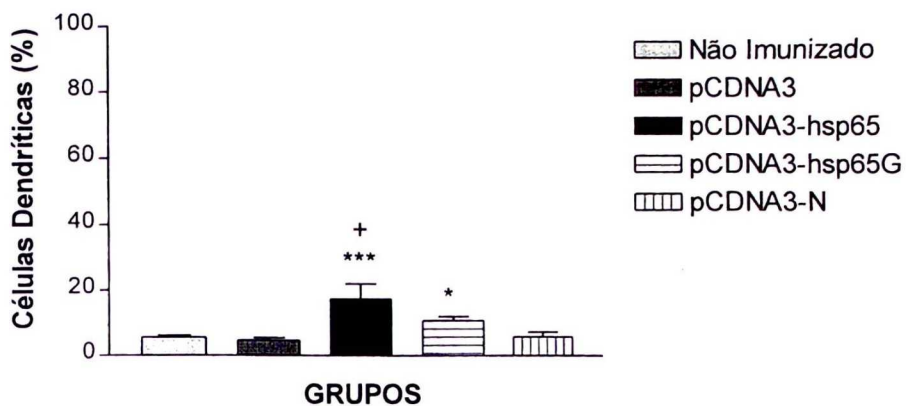


Figura 36 - Percentual de linfócitos dendríticas no baço dos animais imunizados com as construções por via intradérmica (Gene Gun). Células apresentando CD11c foram consideradas células dendríticas. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão do percentual de células dendríticas das células totais do baço de 5 animais individuais. (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$ em relação aos grupos controles (Não Imunizado e pCDNA3). (+) $p < 0,05$ em relação aos grupos pCDNA3-hsp65G e pCDNA3-N. Esses dados são representativos de 2 experimentos.

B) INFLUXO DE SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS PARA O BAÇO DOS ANIMAIS IMUNIZADOS COM AS CONSTRUÇÕES DE DNA POR VIA INTRAMUSCULAR:

Assim como para os animais imunizados com Gene Gun, a avaliação do influxo de células para o baço foi realizada para os animais imunizados com pcDNA3-hsp65, pcDNA3-hsp65G e pcDNA3-N. O influxo de macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e linfócitos T, incluindo linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foi avaliado nesses grupos, 30 dias após a 3^a imunização.

A população de linfócitos B (células CD19⁺) do baço dos animais imunizados com pcDNA3-hsp65, pcDNA3-hsp65G e pcDNA3-N aumentou significativamente em relação aos controles (Não Imunizado e pcDNA3) (Figura 37). Não houve diferença significativa entre os animais imunizados com pcDNA3-hsp65 e pcDNA3-hsp65G. Entretanto, o percentual de células B no baço dos animais imunizados com pcDNA3-N foi menor que o percentual de células B do baço dos animais imunizados com pcDNA3-hsp65 e pcDNA3-hsp65G.

De acordo com a figura 38, os animais imunizados com a construção vacinal pcDNA3-hsp65 e pcDNA3-hsp65G apresentaram aumento da população de linfócitos T (células CD3⁺) no baço, em comparação com os animais controles (Não Imunizado e pcDNA3). A população de células T do baço dos animais imunizados com a construção vacinal pcDNA3-hsp65 e pcDNA3-hsp65G não diferiu entre si. Os animais imunizados com pcDNA3-N tiveram menor percentual de linfócitos T no baço, quando comparados com os animais imunizados com pcDNA3-hsp65 e pcDNA3-hsp65G.

As subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+ também foram analisadas. A população de células T CD4+ (Figura 39) e CD8+ (Figura 40) do baço dos animais imunizados com pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G aumentou em relação aos controles (Não Imunizado e pCDNA3). Não foram verificadas diferenças no percentual de linfócitos T CD4+ e CD8+ no baço dos animais imunizados com pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G. O percentual de linfócitos T CD4+ e CD8+ foi menor no baço dos animais imunizados com pCDNA3-N, em comparação com pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G.

Os animais imunizados com pCDNA3-hsp65, pCDNA3-hsp65G e pCDNA3-N tiveram um aumento no número de macrófagos (células CD11b+) (Figura 41) e células dendríticas (células CD11c+) (Figura 42), quando comparados com os controles (Não Imunizado e pCDNA3). Diferenças estatisticamente significativas não foram detectadas no aumento percentual dessas células no baço dos animais imunizados com a construção vacinal pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G. Mas, o aumento percentual de macrófagos e células dendríticas no baço dos animais imunizados com a construção pCDNA3-N foi menor que aquele verificado para a construção vacinal pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G.

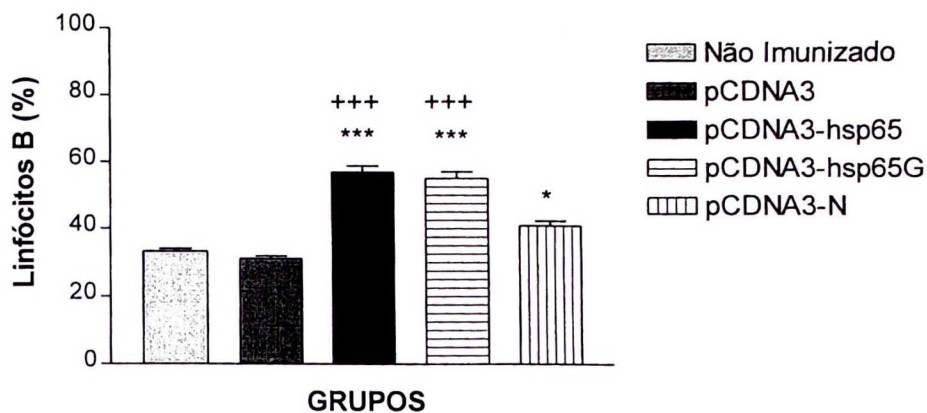


Figura 37 – Percentual de linfócitos B no baço dos animais imunizados com as construções por via intramuscular. Células apresentando CD19 foram consideradas linfócitos B. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão do percentual de linfócitos B das células totais do baço de 5 animais individuais. (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$ em relação aos grupos controles (Não Imunizado e pCDNA3). (+++) $p < 0,001$ em relação aos grupos pCDNA3-hsp65G e pCDNA3-N. Esses dados são representativos de 2 experimentos.

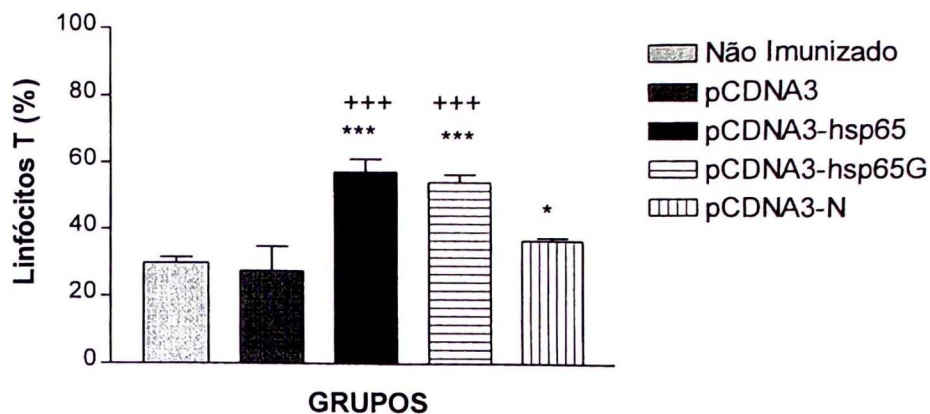


Figura 38 – Percentual de linfócitos T no baço dos animais imunizados com as construções por via intramuscular. Células apresentando CD3 foram consideradas linfócitos T. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão do percentual de linfócitos T das células totais do baço de 5 animais individuais. (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$ em relação aos grupos controles (Não Imunizado e pCDNA3). (+++) $p < 0,001$ em relação aos grupos pCDNA3-hsp65G e pCDNA3-N. Esses dados são representativos de 2 experimentos.

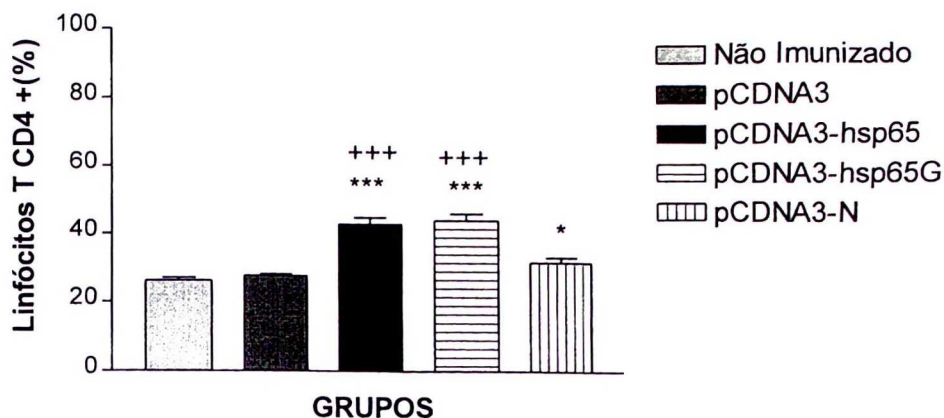


Figura 39 – Percentual de linfócitos T CD4+ no baço dos animais imunizados com as construções por via intramuscular. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão do percentual de linfócitos T CD4+ das células totais do baço de 5 animais individuais. (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$ em relação aos grupos controles (Não Imunizado e pCDNA3). (+++) $p < 0,001$ em relação aos grupos pCDNA3-hsp65G e pCDNA3-N. Esses dados são representativos de 2 experimentos.

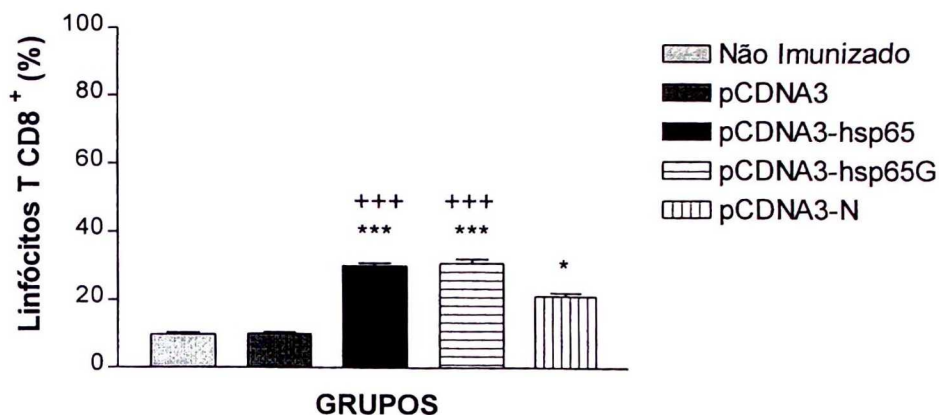


Figura 40 - Percentual de linfócitos T CD8+ no baço dos animais imunizados com as construções por via intramuscular. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão do percentual de linfócitos T CD8+ das células totais do baço de 5 animais individuais. (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$ em relação aos grupos controles (Não Imunizado e pCDNA3). (+++) $p < 0,001$ em relação aos grupos pCDNA3-hsp65G e pCDNA3-N. Esses dados são representativos de 2 experimentos.

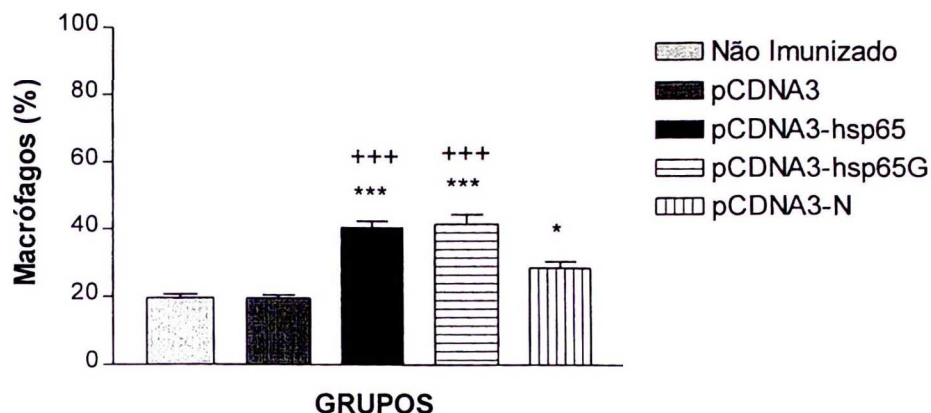


Figura 41 – Percentual de macrófagos no baço dos animais imunizados com as construções por via intramuscular. Células apresentando CD11b foram consideradas macrófagos. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão do percentual de macrófagos das células totais do baço de 5 animais individuais. (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$ em relação aos grupos controles (Não Imunizado e pCDNA3). (+++) $p < 0,001$ em relação aos grupos pCDNA3-hsp65G e pCDNA3-N. Esses dados são representativos de 2 experimentos.

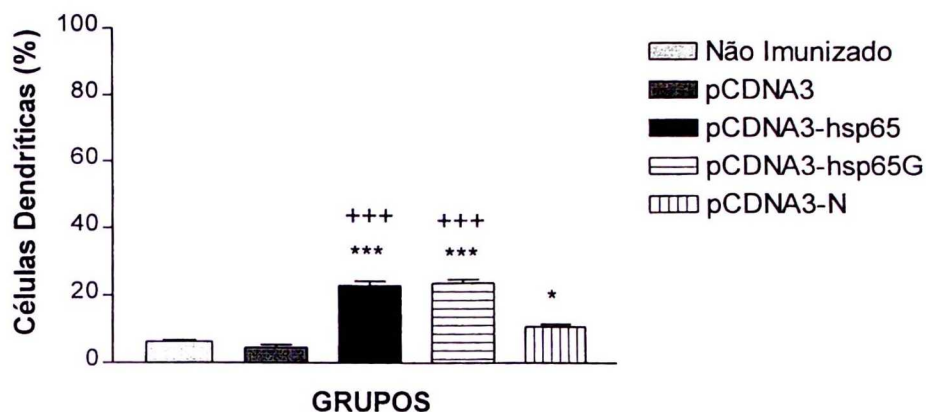


Figura 42 - Percentual de células dendríticas no baço dos animais imunizados com as construções por via intramuscular. Células apresentando CD11c foram consideradas células dendríticas. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão do percentual de células dendríticas das células totais do baço de 5 animais individuais. (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$ em relação aos grupos controles (Não Imunizado e pCDNA3). (+++) $p < 0,001$ em relação aos grupos pCDNA3-hsp65G e pCDNA3-N. Esses dados são representativos de 2 experimentos.

4- DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE *MOTIFS* CpG PRESENTE NAS CONSTRUÇÕES DE DNA:

De acordo com a análise feita pelo programa DNAsis (Tabelas 14 e 15), a construção vacinal original pCDNA3-hsp65 apresenta 7 *motifs* GACGTT e 2 *motifs* AACGTT, que são estimulantes de células de camundongos. Além desses CpGs imunoestimulantes, a vacina contém 4 seqüências neutralizantes, sendo 1 GCCGTT e 3 CGCGCG. Dos 7 *motifs* GACGTT imunoestimulantes, 2 estão no vetor pCDNA3, 3 estão em 510 pb da extremidade 5'do inserto (codificante da extremidade N-terminal da Hsp65) e 2 estão no fragmento *downstream*. Os *motifs* AACGTT estão contidos no vetor pCDNA3. A seqüência neutralizante GCCGTT está presente no fragmento *downstream* e CGCGCG está no vetor pCDNA3 (1 seqüência) e no fragmento *downstream* (2 seqüências).

Na Tabela 15 está a quantificação dos *motifs* CpGs nas outras construções de DNA. A construção pCDNA3-hsp65G contém 9 *motifs* imunoestimulantes, sendo 7 *motifs* GACGTT e 2 *motifs* AACGTT; e 4 *motifs* neutralizantes (1 GCCGTT e 3 CGCGCG). A construção pCDNA3-hsp65G apresenta 5 *motifs* GACGTT, 2 AACGTT e 1 *motif* neutralizante (CGCGCG). Sete *motifs* imunoestimulantes estão presentes na construção pCDNA3-N, sendo 5 GACGTT e 2 AACGTT; além desses, 1 *motif* neutralizante CGCGCG. A construção pCDNA3-N59 contém 4 *motifs* CpG estimulantes, que estão contidos no vetor pCDNA3, não estão na seqüência do inserto (59 pb). A construção contendo o fragmento *downstream* (pCDNA3-DS) apresenta 4 seqüências

imunoestimulantes, sendo 4 delas GACGTT e 2 AACGTT, e 4 seqüências neutralizantes, sendo 1 GCCGTT e 3 CGCGCG.

Tabela 14 - Determinação dos *motifs* CpG no inserto da construção vacinal original pCDNA3-hsp65:

| | | Vetor pCDNA3 | 59 pb da extremidade 5' | 510 pb (N-terminal da Hsp65) | 1251 pb (C-terminal da Hsp65) | 1324 pb (fragmento <i>downstream</i>) | TOTAL |
|--------|--------|-----------------|-------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--|-------|
| GACGTT | Est. | 2 | 0 | 3 | 0 | 2 | 7 |
| AACGTT | Est. | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| GCCGTT | Neutr. | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| CGCGCG | Neutr. | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 |

Est. = Estimulante Neutr. = Neutralizante

Tabela 15 - Determinação dos cinco *motifs* CpG nas construções de DNA:

| | pCDNA3 | pCDNA3- hsp65 | pCDNA3- hsp65G | pCDNA3- N | pCDNA3- N59 | pCDNA3- DS |
|--------|--------|------------------|-------------------|--------------|----------------|---------------|
| GACGTT | 2 | 7 | 5 | 5 | 2 | 4 |
| AACGTT | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| GCCGTT | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| CGCGCG | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 |

V- DISCUSSÃO:

A tuberculose tem sido implicada como uma das maiores causas de mortalidade e morbidade dos últimos anos, nos países em desenvolvimento (WHO, 2000). É considerada um problema global, causando mais de 3 milhões de mortes anuais (Bloom & Murray, 1992; Dolin *et al*, 1994; Raviglione *et al*, 1997; Snider *et al*, 1998). *M. tuberculosis* infecta cerca de 1/3 da população mundial, acometendo 18,2% da população economicamente ativa. O surgimento de cepas de *M. tuberculosis* multi-resistentes às drogas (Snider *et al*, 1994) e aumento de infecção por vírus HIV (Haas & Des Prez, 1994) são fatores que estão diretamente associados com o aumento do número de casos de tuberculose. Apesar do desenvolvimento de drogas efetivas para o seu tratamento e o desenvolvimento de vacina para sua prevenção, a tuberculose continua se disseminando em todo o mundo.

A prevenção da tuberculose é feita com programas de vacinação utilizando BCG (Bacilo de Calmette-Guérin), cepa de *M. bovis* atenuada por subcultivos repetidos. A vacina BCG tem sido amplamente utilizada em muitos países em desenvolvimento como componente importante dos programas de controle da tuberculose. Entretanto, tem sido vastamente descrito na literatura, a eficácia variável dessa vacina. Colditz *et al* (1994), Rodrigues & Smith (1990) e Sterne *et al* (1998) têm reportado que ensaios clínicos controlados têm revelado baixa efetividade do BCG em adultos, possivelmente isso deva estar associado à

atenuação da vacina (Behr & Small, 1997). A eficácia do BCG varia de 0 a 80% (Enserinck, 2001). Assim, o desenvolvimento de novas vacinas contra tuberculose é prioritário.

Recentemente, vários pesquisadores têm desenvolvido novos candidatos a vacinas contra tuberculose, na tentativa de substituir o BCG (Kaufmann, 2000; Lowrie *et al*, 1997; Orme *et al*, 1997; Orme, 1995). Orme *et al* (2001) descreveram que 170 candidatos ou combinações de candidatos à vacina tem sido testados em camundongos e/ou cobaias e, cujos resultados tem se mostrado bastante promissores. Dentre esses candidatos, 19,4% são vacinas de DNA, 11,8% são vacinas recombinantes, 48,8% são vacinas de subunidade e 5,3% são vacinas auxotróficas.

Recentemente, a imunização com DNA tem sido considerada uma boa estratégia para o desenvolvimento de vacinas (Tang *et al*, 1994), por causa de suas vantagens às vacinas vivas e as vacinas de subunidades: (1) As vacinas de DNA mimetizam os efeitos das vacinas vivas pois induz respostas de células T CD8+ restritas a MHC classe I, o que é uma vantagem em relação às vacinas de subunidades; (2) Desencadeiam potente resposta humoral e celular; (3) Induzem memória de células B e T, (4) Requerem baixo custo efetivo para sua produção e estocagem; (5) São seguras (Gurunathan *et al*, 2000).

Um dos candidatos potenciais a vacina contra tuberculose é a vacina de DNA pCDNA3-hsp65, desenvolvida pelo grupo de pesquisa do Dr. Célio Lopes Silva. Lowrie *et al* (1995), Tascon *et al* (1996), Lowrie *et al* (1997a, 1997b, 1997c) e Silva *et al* (1999) têm demonstrado que a vacina pCDNA3-hsp65, cujo inserto é constituído do gene hsp65 de *Mycobacterium leprae* (1820 pb) e um

fragmento *downstream* , não codificante (1324 pb), apresentou atividade protetora na tuberculose experimental em camundongos BALB/c. Em 1999, Silva *et al* demonstraram que a vacina pCDNA3-hsp65, além de proteger camundongos desafiados com *Mycobacterium tuberculosis*, apresentou atividade terapêutica em camundongos infectados *M. tuberculosis*, curou a infecção causada por um isolado clínico de *M. tuberculosis* (CLS52), que é resistente à isoniazida e impediu a reativação da infecção quando os camundongos foram tratados com dexametasona, glicocorticóide imunossupressor.

Entretanto, posteriormente, Turner *et al* (2000) questionaram a eficácia e segurança de vacinas contra tuberculose que codificam proteínas de choque térmico (Hsps). Esses autores reportaram que a construção vacinal pCDNA3-hsp60, codificante da Hsp60 de *Mycobacterium tuberculosis*, não foi imunogênica nem tampouco protetora no modelo de cobaias, embora tenha mostrado imunogenicidade em modelos murinos. Além disso, causou severos danos pulmonares nos animais. Turner *et al* (2000) também demonstraram que pCDNA3-hsp60 (*M. tuberculosis*) careceu de atividade imunoterapêutica no curso da infecção pulmonar, apesar de ter reduzido a carga bacteriana no baço dos animais infectados com *M. tuberculosis*.

A única diferença estrutural entre essas duas construções vacinais é que pCDNA3-hsp65, além do gene hsp65 de *M. leprae*, contém um fragmento *downstream* a esse gene e pCDNA3-hsp60 apresenta somente o gene hsp65 de *M. tuberculosis*. Outra diferença importante entre as duas vacinas de DNA é a origem bacteriana do gene hsp65, onde o inserto de pCDNA3-hsp65 provém de *M. leprae* e pCDNA3-hsp60 provém de *M. tuberculosis*. Existem diferenças de

identidade entre as proteínas Hsp65 de *M. leprae* e *M. tuberculosis*, sendo de aproximadamente 5-10% (Clark-Curtiss, 1990).

Então, diante dessas prerrogativas, propusemo-nos a investigar, mais refinadamente, a imunogenicidade de diferentes fragmentos do inserto da vacina pCDNA3-hsp65 (vetor pCDNA3 + gene hsp65 de *M. leprae* (1820 pb) + fragmento *downstream* de 1324 pb), verificando a participação do fragmento *downstream* na indução da resposta imune humoral e celular em modelo murino.

Para tal propósito, em colaboração com Dra. Sylvia Cardoso Leão (UNIFESP), subclones da vacina pCDNA3-hsp65 foram construídos a partir de fragmentos do inserto restritos com *Xho*I (Figuras 1, 2 e 3). As clonagens forneceram quatro novas construções de DNA, que foram posteriormente utilizadas em esquemas de imunização. Essas construções foram denominadas pCDNA3-hsp65G (vetor pCDNA3 + gene hsp65), pCDNA3-N (vetor pCDNA3 + extremidade N- terminal da proteína Hsp65), pCDNA3-N59 (vetor pCDNA3 + 59 pb codificante da extremidade N-terminal da proteína Hsp65) e pCDNA3-DS (vetor pCDNA3 + fragmento *downstream*) (Figuras 2 e 3).

As construções de DNA foram utilizadas em esquemas de imunização, previamente mostrados em Material e Métodos, utilizando duas vias de administração: via intradérmica (Gene Gun) e via intramuscular. Essas rotas foram utilizadas com a finalidade de comparar os tipos de resposta imune gerados após a imunização com DNA nu (via intramuscular) e com DNA adsorvido em partículas de ouro (sistema carreador) que otimiza a captura do DNA pela célula (via intradérmica). Tem sido reportado por vários autores que rotas de administração diferentes podem interferir na imunogenicidade de preparações

vacinais. Os animais foram imunizados com 1 µg/dose para imunização intradérmica (Gene Gun) e 100 µg/dose para imunização intramuscular. Entre cada imunização, foi estabelecido um intervalo de 15 dias. Os animais foram sacrificados 30 dias após a 3ª imunização e a resposta imune humoral e celular foram avaliadas. A resposta imune humoral foi avaliada pela determinação dos títulos de anticorpos Hsp65- específicos por ELISA, estabelecendo uma cinética a cada 15 dias após a 1ª imunização até o final do esquema de imunização. A resposta imune celular foi analisada através de três parâmetros: proliferação de células totais do baço e linfonodos ingüinais medida pela incorporação de timidina triciada, determinação dos níveis de citocinas IL-4, IL-10, IFN-gama e IL-12 no sobrenadante de células totais do baço e linfonodos ingüinais por ELISA e avaliação, por FACS, do influxo de linfócitos B, linfócitos T CD4+ e CD8+, macrófagos e células dendríticas para o baço dos animais imunizados com as construções de DNA.

Por via intradérmica, os animais imunizados com a construção vacinal original pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G produziram níveis significativos de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a anti-Hsp65 (Figuras 5, 6 e 7), em relação aos controles (não imunizado e vetor pCDNA3). Entretanto, a vacina pCDNA3-hsp65 induziu maior resposta humoral que pCDNA3-hsp65G. Esses dados mostraram que a ausência do fragmento *downstream* na construção pCDNA3-hsp65G interferiu na resposta de anticorpos. Esses dados sugerem que o fragmento *downstream* contém muitos motivos CpG, que estimulam produção de anticorpos por linfócitos B (Krieg, 2002).

A construção vacinal original pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G também induziram, por via intradérmica (Gene Gun), resposta proliferativa significativa das células totais do baço (Figura 12) e dos linfonodos ingüinais (Figura 13) e elevados níveis das citocinas IL-4, IL-10, IFN-gama, IL-12 no sobrenadante de células do baço (Figuras 15, 17, 19 e 21) e dos linfonodos ingüinais (Figuras 16, 18, 20, 22) dos animais imunizados. Além disso, a análise por FACS mostrou que os animais imunizados com a vacina pCDNA3-hsp65 e com pCDNA3-hsp65G apresentaram influxo significativo de linfócitos B (Figura 31), linfócitos T (Figura 32), incluindo subpopulações de linfócitos T CD4+ (Figura 33) e CD8+ (Figura 34), macrófagos (Figura 35) e células dendríticas (Figura 36) para o baço, quando comparados com os animais controle (não imunizado e pCDNA3). Entretanto, a resposta celular induzida pela vacina pCDNA3-hsp65 é maior que aquela induzida por pCDNA3-hsp65G, sugerindo, portanto, que o fragmento *downstream* também tem participação relevante na indução da resposta imune celular.

Essa diferença na magnitude da resposta imune humoral e celular desencadeada pela construção vacinal original pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65, por via intradérmica (Gene Gun), pode ser explicada pela pequena quantidade de DNA (1 µg/dose) bombardeada na pele dos animais imunizados. Enquanto 3 µg da vacina pCDNA3-hsp65 (pCDNA3 + gene hsp65 (1820 pb) + fragmento *downstream* (1324 pb)) foi capaz de desencadear elevada resposta imune, 3 µg de pCDNA3-hsp65G (pCDNA3 + gene hsp65) não o foi, sugerindo que a ausência do fragmento *downstream* exerce efeito relevante na indução da resposta imune. Provavelmente, esse efeito é devido à presença de *motifs* CpG

no fragmento *downstream* (Tabela 14 e 15). Tem sido descrito que a quantidade ótima de *motifs* CpG, sob a forma de oligonucleotídeos sintéticos, que estimulam resposta imune em camundongos corresponde a 50 – 100 µg (Krieg, 2002; Chu *et al*, 1996). Assim, a excisão do fragmento *downstream* reduz a quantidade de CpG imunoestimulatórios, pois ele contém 6 *motifs* CpG.

Por via intramuscular, os animais imunizados com a vacina pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G apresentaram títulos significativos de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a anti-Hsp65 (Figuras 8, 9 e 10), comparados com os animais controles (não imunizado e pCDNA3). Os títulos de anticorpos induzidos pela vacina pCDNA3-hsp65 e por pCDNA3-hsp65G não foram diferentes entre si.

As respostas proliferativas das células totais do baço (Figura 13) e linfonodos inguinais (Figura 14), os níveis das citocinas IL-4, IL-10, IFN-gama e IL-12 produzidos pelas células do baço (Figuras 23, 25, 27 e 29) e pelas células dos linfonodos ingüiniais (Figuras 24, 26, 28 e 30) e o influxo de linfócitos B (Figura 37), linfócitos T (Figura 38), incluindo as subpopulações de células T CD4+ (Figura 39) e CD8+ (Figura 40), macrófagos (Figura 41) e células dendríticas (Figura 42) para o baço dos animais imunizados com as construções pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G foram significativas, em comparação com os controles (não imunizado e pCDNA3).

Esses dados sugerem que, por via intramuscular, a ausência do fragmento *downstream* não interferiu na indução da resposta imune humoral nem celular. Entretanto, é importante salientar que a construção vacinal apresenta 9 *motifs*

CpG imunestimulantes e 4 neutralizantes, enquanto que pCDNA3-hsp65G possui 7 motifs estimulantes e 1 neutralizante. Desse modo, a construção vacinal pCDNA3-hsp65 deveria ter induzido resposta imune em menor magnitude que pCDNA3-hsp65G.

Os animais imunizados com a construção pCDNA3-N produziram resposta de anticorpos (Figuras 8, 9 e 10) significativamente diferente dos animais controles (não imunizado e pCDNA3) por via intramuscular. Entretanto, por via intradérmica, essa resposta não diferiu dos controles (Figuras 4, 5 e 6). A resposta humoral induzida por essa construção, quando administrada por via intramuscular, foi menor que a resposta induzida pela vacina pCDNA3-hsp65 e por pCDNA3-hsp65G.

A resposta celular, induzida por pCDNA3-N, medida através dos parâmetros de proliferação celular (Figuras 14 e 15), perfil de IL-4, IL-10, IFN-gama e IL-12 produzido por células do baço (Figuras 24, 25, 26 e 27, respectivamente) e dos linfonodos inguinais (Figuras 28, 29, 30 e 31, respectivamente) e influxo de linfócitos B (Figura 38), linfócitos T (Figura 39) e as subpopulações de células T CD4+ (Figura 40) e CD8+ (Figura 41), macrófagos (Figura 42) e células dendríticas (Figura 43), foi diferente dos controles. Quando foi comparada com aquela induzida por pCDNA3-hsp65 e pCDNA3hsp65G, a resposta celular foi induzida em menor magnitude.

Isso sugere que, por via intramuscular, pCDNA3-N (569 pb codificante da extremidade N-terminal da Hsp65) foi capaz de codificar epitopos imunogênicos que estimulou a resposta humoral e celular, embora tenha sido em menor quantidade que pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G. Em contrapartida, como

observado para a imunização intradérmica, pCDNA3-N não desencadeou resposta humoral nem celular significativas, supostamente, devido à quantidade de DNA injetado pelo Gene Gun (1 µg/dose), que diminuiu a quantidade de epitopos imunogênicos, comprometendo o desencadeamento da resposta de anticorpos.

A construção pCDNA3-DS não foi capaz de desencadear resposta imune humoral nem resposta celular após a imunização intradérmica ou intramuscular. A avaliação da resposta imune foi realizada em relação ao antígeno Hsp65, não foi verificado a indução da resposta imune contra antígeno bruto de *M. tuberculosis*. Esse resultado já era esperado pois esse fragmento não contém nenhuma ORF, indicando que não codifica nenhuma proteína.

A construção pCDNA3-N59 também não é indutora de resposta imune humoral nem resposta celular significativamente diferente dos controles. Isso é devido à pequena quantidade de aminoácido que é codificado por 59 pb do gene hsp65 presente nessa construção de DNA. Assim, é provável que epitopos imunogênicos não tenham sido codificados em quantidade suficiente para estimular resposta imune detectável.

De acordo com a figura 7, a imunização intradérmica (Gene Gun) desencadeia potente resposta de anticorpos, sendo a produção de IgG1 mais elevada que a de IgG2a, caracterizando uma resposta mista de anticorpos. Já a imunização intramuscular (Figura 8) induziu produção predominantemente maior de IgG2a que IgG1.

Os resultados referentes à resposta de citocinas para a imunização intradérmica (Gene Gun) indicaram que os níveis de IL-10 (citocina Th2), mas não IL-4, estão aumentados. Os níveis de IFN-gama e IL-12 detectados também estavam aumentados. Isso sugere que, de fato, por via intradérmica utilizando o Gene Gun, o padrão de resposta é misto. Esses dados corroboram com aqueles apresentados por Rosinha *et al* (2000), que propõem que a imunização com o Gene Gun desencadeia resposta mista. Em contrapartida, Pertmer *et al* (1996) demonstraram que camundongos imunizados repetidamente utilizando gene gun (via intradérmica) apresentam a produção de IL-4 aumentada, enquanto a produção de IFN-gama diminui concomitantemente. Além do perfil de citocinas, esses autores mostraram que a subclasse de imunoglobulina predominante após imunização por Gene Gun é IgG1.

A produção de IFN- γ é crucial para o controle da tuberculose. De modo que, a resposta imune evocada por uma vacina deve induzir produção de IFN-gama. Outra citocina importante é IL-12, pois permite a diferenciação de células Th0 para células Th1, que produzem IFN-gama. Vários autores têm descrito que o controle da tuberculose é mediado por resposta Th1. Como foi observado, os níveis de IFN-gama e IL-12 estão proeminentemente aumentados, quando os animais foram imunizados por via intramuscular, indicando que o padrão de resposta celular induzida é predominantemente Th1. Desse modo, uma vacina contra tuberculose deve supostamente induzir citocinas Th1, como IFN-gama e IL-12.

Os resultados aqui apresentados são concordantes com aqueles obtidos para a resposta imune humoral, por Feltquate *et al* (1997), onde o anticorpo

predominante foi IgG2a. Esses autores compararam as diferenças no perfil de citocinas produzidas após imunização com Gene Gun e injeção intramuscular. A resposta Th2 e elevados títulos de IgG1 ocorrem preferencialmente após imunização com Gene Gun, já a resposta Th1 e elevados títulos de IgG2a são produzidos principalmente após imunização intramuscular.

O perfil de resposta humoral (IgG1 e IgG2a) está diretamente correlacionado com a presença das citocinas IL-4 e IFN-gama, caracterizando respostas Th2 e Th1, respectivamente. Isso se deve ao fato de IL-4 e IFN-gama promover mudança de isotipo de imunoglobulina para IgG1 e IgG2a, respectivamente. Mas, é importante ressaltar que a produção de IL-4 não está relacionada a IgG1, assim como a produção de IFN-gama não implica na mudança de isotipo para IgG2a (Chu *et al*, 1996).

É importante frisar que, de acordo com os dados obtidos, a rota de administração definiu o tipo de resposta imune gerada. Por via intramuscular, as construções de DNA desencadaram resposta tipo Th1, posto que grande quantidade de IFN-gama é produzida. Já, por via intradérmica, as construções de DNA induziram resposta mista, pois havia prevalência de IL-10 e IFN-gama.

VII – CONCLUSÕES:

Baseado nos resultados apresentados, é possível inferir que:

- Por via intradérmica (Gene Gun), o fragmento *downstream* tem participação efetiva na resposta imune desencadeada, visto que a construção vacinal pCDNA3-hsp65 induziu resposta imune mais elevada que pCDNA3-hsp65G. Hipotetizamos que sua participação na otimização da resposta imune pela construção vacinal deveu-se a presença de motifs CpGs nesse fragmento.
- Por via intramuscular, o fragmento *downstream* não atuou na resposta desencadeada pelas construções de DNA, pois a construção vacinal e pCDNA3-hsp65G induziram resposta imune na mesma magnitude.
- A construção pCDNA3-N (codificante da extremidade N-terminal da Hsp65) só foi imunogênica quando administrada por via intramuscular, induzindo resposta imune menos potente que aquela induzida pela construção vacinal pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G.
- A construção pCDNA3-DS (fragmento *downstream*) não induziu resposta imune significativa em relação à proteína hsp65, mostrando que esse fragmento não deve estar relacionado ao gene hsp65.
- A construção pCDNA3-N59 (59 pb codificante da N-terminal da Hsp65) também não desencadeou resposta imune, indicando que esse fragmento de DNA não deve codificar epitopos imunogênicos.

- A imunização com as construções de DNA, por via intradérmica, promoveu o favorecimento de resposta Th2/Th1, porém com tendência para Th2. Já, por intramuscular, a resposta foi caracteristicamente Th1.

Então, é importante ressaltar que o fragmento *downstream* não induziu nem otimizou a resposta imune nos camundongos imunizados com as construções de DNA por via intramuscular. Assim, sugere-se que esse fragmento seja retirado da construção vacinal original pCDNA3-hsp65, embora seja necessária a realização de ensaios de proteção em modelo murino para reafirmar os dados aqui obtidos.

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Abou-Zeid C, Gares MP, Inwalrd J, Janseen R, Zhang Y, Yong DB, Hetzel C, Lamb JR, Baldwin SL, Orme IM, Yeremeev V, Nikonenko BV, Apt AS. Induction of a type 1 immune response to a recombinant antigen from *Mycobacterium tuberculosis* expressed in *Mycobacterium vaccae*. *Infect Immun* 1997; Vol. 65, pag. 1856-1862

Agadjanyan MG, Kim JJ, Trivedi N, Wilson DM, Monzavi-Karbassi B, Morrison LD, Nottingham LK, Dentchev T, Tsai A, Dang K, Chalian AA, Maldonado MA, Williams WV, Weiner DB. CD86 (B7-2) can function to drive MHC-restricted antigen-specific CTL responses in vivo. *J Immunol* 1999; Vol. 162, pag. 3417-3427

Akbari O, Panjwani N, Garcia S, Tascon R, Lowrie D, Stockinger B. DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key eventes for immunity. *J Exp Med* 1999; Vol. 189, pag. 169-178

Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, Bhardwaj N. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via $\alpha\text{V}\beta 5$ and CD36, and

cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1998; Vol. 188, pag. 1359-1368

Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998; Vol. 392, pag. 86-89

Andersen P, Askgaard D, Ljungqvist L, Bentzon MW, Heron I. T-cell proliferative response to antigens secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1991; Vol. 59, pag. 1558-1563

Andersen P, Askgaard D, Ljungqvist L, Bennedsen J, Heron I. Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. *Infect Immun* 1991; Vol. 59, pag. 1905-1910

Armstrong JA, Hart PDA. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J Exp Med* 1971; Vol. 134, pag. 713-740

Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, Remold HG. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF- α . *J Immunol* 1998; Vol. 161, pag. 636-2641

Bariety M, Villemin and the inoculability of tuberculosis. *Bull Acad Natl Med* 1965; Vol. 149, No. 32, pag. 761-767

Barnes DS. Historical perspectives on the etiology of tuberculosis. *Microbes Infect* 2000; Vol. 2, pag. 431-440

Barnes PF, Bloch AB, Davidson PT, Snider D Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *N. Engl J Med* 1991; Vol. 324, pag. 1644-1650

Barnes PF, Abrams JS, Lu S, Sieling PA, Rea TH, Modlin RL. Patterns of cytokine production by *Mycobacterium*-reactive human T-cell clones. *Infect Immun* 1993; Vol. 61, No. 8, pag. 197-203

Beckman EM, Porcelli AS, Morita CT, Behar SM, Furlong ST, Brenner MB. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted $\alpha\beta$ T cells. *Nature* 1994; Vol. 372, pag. 691-694

Behar SM, Dascher CC, Grusby MJ, Wang CR, Brenner MB. Susceptibility of mice deficient in CD1d or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 1999; Vol. 189, pag. 1973-1980

Behr MA & Small PM. Has BCG attenuated to impotence? *Nature* 1997; Vol 398, No. 6647, pag. 133-134

Behr MA & Small PM. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine* 1999; Vol. 17, pag. 915-922

Bloom BR & Murray CJ Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* 1992; Vol. 257, No. 5073, pag. 1055- 1064

Bonato VLD, Lima VMF, Tascon RE, Lowrie DB, Silva CL. Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis* infected mice. *Infect Immun* 1998; Vol. 66, pag. 169-175

Bosio CM, Gardner D, Elkins KL. Infection of B cell deficient mice with CDC1551, a clinical isolate of *Mycobacterium tuberculosis*: delay in dissemination and development of lung pathology. *J Immunol* 2000; Vol. 164, pag. 6417-6425

Brennan P. Structure of mycobacteria: recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. *Rev Infect Dis* 1989; Suppl 2, pag. S420-S430

Campos-Neto A, Owendale P, Bement T, Koppi TA, Fanslow WC, Rossi MA, Alderson MR. CD40 ligand is not essential for the development of cell-mediated immunity and resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1998; Vol. 160, No. 5, pag. 2037-2041

Canaday DH, Ziebold C, Noss EH, Chervenak KA, Harding CV, Boom WH. Activation of human CD8+ $\alpha\beta$ TCR+ cells by *Mycobacterium tuberculosis* via an alternative class I MHC antigen-processing pathway. J Immunol 1999; Vol. 162, pag. 372-379

Casares S, Inaba K, Brumeanu TD, Steinman RM, Bona CA. Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. J Exp Med 1997; Vol. 186, pag. 1481-1486

Chakerian AA, Alt JM, Perera TV, Dascher CC, Behar SM. Dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* is influenced by host factors and precedes the initiation of T-cell immunity. Infect Immun 2002; Vol. 70, No. 8, pag. 4501-4509

Chan J, Fujiwara T, Brennan P, McNeil M, Turco SJ, Sibile JC, Snapper M, Arsen P, Bloom BR. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. Proc Natl Acad Sci 1989; Vol. 86, No. 7, pag. 2453-2457

Chan J, Tanaka K, Carroll D, Flynn J. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 1995; Vol. 63, No. 2, pag. 736-740

Cherwinski HM, Schumacher JH, Brown KD, Mosmann TR. Two types of mouse helper T cell clone. III- Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays and monoclonal antibodies. J Exp Med 1987; Vol 166, pag. 1229-1244

Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, Lehmann PV, Harding CV. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. J Exp Med 1997; Vol. 186, No. 10, pag. 1623-1631

Clark-Curtiss J. Genome structure of mycobacterial. In: McFadden J (Ed) Molecular Biology of the Mycobacteria. Surrey University Press 1990; pag. 77-96

Clemens DL, Horwitz MA. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. J Exp Med 1995; 181 (1): 257-270

Clemens DL, Horwitz MA. The *Mycobacterium tuberculosis* phagosome interacts with early endosomes and is accessible to exogenously administered transferrin. J Exp Med 1996; 184 (4): 1349-1355

Comstock GW. Epidemiology of tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1982; Vol. 125, pag. 8-15

Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, Mosteller F. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis, Meta-analysis of the published literature. J Am Med Assoc 1994; Vol. 271, No. 9, pag. 698-702

Condon C, Watkins SC, Celluzzi CM, Thompson K, Falo LD Jr. DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. Nat Med 1996; Vol. 2, No. 10, pag. 1122-1128

Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffen JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in IFN- γ gene-disrupted mice. J Exp Med 1993; Vol. 178, pag. 2243-2248

Cooper AM, D'Souza C, Frank AA, Orme IM. The course of *Mycobacterium tuberculosis* infection in the lungs of mice lacking expression of either perforin- or granzyme-mediated cytolytic mechanisms. Infect Immun 1997; Vol. 65, No. 4, pag. 1317-1320

Cooper AM, Magram J, Ferrante J, Orme IM. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*. J Exp Med 1997; Vol. 186, pag. 39-45

Cooper AM, Segal BH, Frank AA, Holland SM, Orme IA Transient loss of resistance to pulmonary tuberculosis in p47^{phox-/-} mice. *Infect Immun* 2000; Vol. 68, No. 3, pag. 1231-1234

Cooper AM, Kipnis A, Turner J, Magram J, Ferrante J, Orme IM. Mice lacking bioactives IL-12 can generate protective, antigen-specific cellular responses to mycobacterial infection only if the IL-12p40 subunit is present. *J Immunol* 2002; Vol. 168, No. 3, pag. 1322-1327

Corr M, Lee DJ, Carson DA, Tighe H. Gene vaccination with naked plasmid DNA: Mechanism of CTL priming. *J Exp Med* 1996; Vol. 184, pag. 1555-1560

Crowle A, Ross EJ, May MH. Inhibition by 1,25 (OH)₂- vitamin D₃ of the multiplication of virulent tubercle bacilli in cultured human macrophages. *Infect Immun* 1987; Vol. 55, pag. 2945-2950

Crowle AJ, Dahl R, Ross E, May MH Evidence that vesicles containing living, virulent *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium avium* in cultured human macrophages are not acidic. *Infect Immun* 1991; Vol. 59, pag. 1823-1831

Cywes C, Godenir NL, Hoppe HC, Scholle RR, Steyn LM, Kirsch RE, Ehlers MR Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to human complement receptor type 3 expressed in Chinese hamster ovary cells. *Infect Immun* 1996; Vol. 64, No. 12, pag. 5373-5383

Cywes C, Hoppe C, Daffe M, Ehlers MR. Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to complement receptor type 3 is mediated by capsular polysaccharides and is strain dependent. *Infect Immun* 1997; Vol. 65, No. 10, pag. 4258-4266

Dannenbergs AM. Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol Today* Vol. 12, pag. 228-233

Das RK. Tuberculosis – historical landmarks. *J. Indian Med Assoc* 2000; Vol. 98, No. 3, pag. 112-114

Davis HL, Schirmbeck R, Reimann J, Whalen RG. DNA-mediated immunization in mice induces a potent MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocyte response to the hepatitis B envelope protein. *Hum Gene Ther* 1995; Vol. 6, pag. 1447-1456

Deck RR, deWitt CM, Donnelly JJ, Liu MA, Ulmer JB. Characterization of humoral immune responses induced by an influenza hemagglutinin DNA vaccine. *Vaccine* 1997; Vol. 15, pag. 71-78

Ding AH, Nathan C, Stuehr D. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 1988; Vol. 141, No. 7, pag. 2407-2412

Dolin PJ, Raviglione MC, Kochi A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. Bull WHO 1999; Vol. 72, pag. 213-220

Dow SW, Roberts A, Vyas J, Rodgers J, Rich RR, Orme IM, Potter TA. Immunization with f-Met peptides induces immune reactivity against *Mycobacterium tuberculosis*. Tubercle Lung Dis 2000; Vol. 80, pag. 5-13

Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. JAMA 1999; Vol. 282, No. 7, pag. 677-686

Edwards KM, Cynamon MH, Voladri RK, Hager CC, Destefano MS, Tham KT, Lakey DL, Bocham MR, Kemodle DS. Iron cofactored superoxide dismutase inhibits host response to *Mycobacterium tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med 2001; Vol. 164, no. 12, pag. 2213-2219

Ernst JD. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 1998; Vol. 66, No. 4, pag. 1277-1281

Flesch I & Kaufmann S. Mycobacterial growth inhibition by interferon gamma activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol 1987; Vol. 138, No. 12, pag. 4408-4413

Flesch I, Kaufmann SHE. Activation of tuberculostatic macrophage functions by gamma interferon, interleukin-4 and tumor necrosis factor. *Infect Immun* 1990; Vol. 58, No. 8, pag. 2675-2677

Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Koller B, Bloom BR. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; Vol. 89, pag. 12013-12017

Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart T, Bloom BR. An essential role for Interferon- γ in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* 1993; Vol. 178, pag. 2249-2254

Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Sypek J, Wolff S, Bloom BR. IL-12 increases resistance of BALB/c mice to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 1995; Vol. 155, No. 5, pag. 2515-2524

Fu TM, Friedman A, Ulmer JB, Liu MA, Donnelly JJ. Protective cellular immunity: cytotoxic T-lymphocyte responses against dominant and recessive epitopes of influenza virus nucleoprotein induced by DNA immunization. *J Virol* 1997; Vol. 71, pag. 2715-2721

Fu TM, Ulmer JB, Caulfield MJ, Deck RR, Friedman A, Wang S, Liu X, Donnelly JJ, Liu MA. Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes. *Mol Med* 1997; Vol. 3, pag. 362-371

Glickman MS, Jacobs WR Jr. Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. *Cell* 2001; Vol. 104, No. 4, pag. 477-485

Gomes MS, Flórido M, Pais TF, Appelberg R. Improved clearance of *Mycobacterium avium* upon disruption of the inducible nitric oxide synthase gene. *J Immunol* 1999; Vol. 162, pag. 6734-6739

Gordon AH, Hart PD, Young MR. Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature* 1980; Vol. 286, No. 5768, pag. 79-80

Grange JM, Gibson J, Osborn TW, Collins CH, Yates MD. What is BCG? *Tubercle* 1983; Vol. 64, no. 2, pag. 129-139

Guleria I, Teitelbaum R, McAdam RA, Kalpana G, Jacobs WR, Bloom BR. Auxotrophic vaccines for tuberculosis. *Nat Med* 1999; Vol 2, pag. 334-337

Gurunathan S, Prussin C, Sacks DL, Seder RA. Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection. *Nat Med* 1998; Vol. 4, pag. 1409-1415

Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: Immunology, Application and Optimization. *Ann Rev Immunol* 2000; Vol. 18, pag. 927-974

Haworth R, Platt N, Keshav S, Hughes D, Darley E, Suzuki H, Kodama T, Kurihara Y, Gordon S. The macrophage scavenger receptor type A is expressed by activated macrophages and protects the host against lethal endotoxic shock. *J Exp Med* 1997; Vol. 186, No. 9, pag. 1431-1439

Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1997; Vol. 159, pag. 635-643

Hingley-Wilson SM, Sly LM, Reiner NE, McMaster WR. The immunobiology of the mycobacterial infected macrophages. *Mod Asp Immunobiol* 2000; Vol. 1, No. 3, pag. 96-101

Hirsch CS, Ellner JJ, Russell DG, Rich EA. Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor alpha mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages. 1994; Vol. 152, No. 2, pag. 743-753

Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Maslesa-Galic S. Recombinant bacillus calmette-Guérin (BCG) vaccines expressing the major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; Vol. 97, pag. 13853-13858

Huygen K, Content J, Dennis O, Montgomery DL, Yawman AM, Deck RR, DeWitt CM, Orme IM, Baldin S, D'Souza C, Drowart A, Lozes E, Vandebussche P, Van Vooren JP, Liu MA, Ulmer JB. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nat Med* 1996; Vol. 2, No. 8, pag. 893-898

Hingley-Wilson SM, Sly LM, Reiner NE, McMaster WR The immunobiology of the mycobacterial infected macrophage. *Mod Asp Immunobiol* 2000; Vol 1, No. 3, pag. 96- 101

Huebner RE. BCG vaccination in the control of tuberculosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; Vol. 215, pag. 263-282

Imaeda T, Kanetsuna F, Galindo B. Ultrastructure of cell walls of genus *Mycobacterium*. *J Ultrastruct Res* 1968; Vol. 25, No. 1, pag. 46-63

Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalysed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 1992; Vol. 298, No. 2, pag. 431-437

Jackett OS, Aber VR, Lowrie DB. Virulence and resistance to superoxide, low pH and hydrogen peroxide among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. J Gen Microbiol 1978; Vol. 104, No. 1, pag. 37-45

Jackson SH, Gallin JI, Holland SM. The p47phox mouse knock-out model of chronic granulomatous disease. J. Exp Med 1995; Vol. 182, pag. 751-758

Johnson CM, Cooper AM, Frank AA, Bonorino CB, Wysoki LJ, Orme IM. Mycobacterium tuberculosis aerogenic challenge infections in B cell-deficient mice. Tubercle Lung Dis 1997; Vol. 78, pag. 257-261

Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM. Zinsser Microbiología. 20a. ed. Editorial Médica Panamericana S.A 1998. Traducción por Dr. Marta Boxaca, Nora Meeroff, Karen Mikkelsen. Buenos Aires, Argentina

Kaufmann SHE, Vath U, Thole JER, Van Embden JDA, Emmrich F. Enumeration of T cells reactive with *M. tuberculosis* organisms and specific for the recombinant mycobacterial 64 kilodalton protein. Eur J Immunol 1987; Vol. 17, pag 351-357

Kaufmann SHE. CD8+ lymphocytes in intracellular microbial infections. Immunol Today 1988; Vol. 9, pag. 168-174

Kaufmann SHE. Heat shock proteins and the immune response. *Immunol Today* 1990; Vol 11, No. 4, pag 129-135

Kaufmann SHE. Immunity to intracellular bacteria. *Ann Rev Immunol* 1993; Vol. 11, pag. 129-163

Kaufmann SH. Is the development of a new tuberculosis vaccine possible? *Nat Med* 2000; Vol. 6, No. 9, pag. 955-960

Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG, Chupp GL, Meek BB, Fenton MJ, Kornfeld H. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun* 1997; Vol. 65, pag. 298-304

Kernodle DS, Cynamon MH, Hager CC. A tuberculosis vaccine prototype constructed by diminishing an anti-apoptotic microbial factor. *Clin Infect Dis* 2001; Vol. 33, pag. 1154

Klinman DM, Sechler JM, Conover J, Gu M, Rosenberg AS. Contribution of cells at the site of DNA vaccination to the generation of antigen-specific immunity and memory. *J Immunol* 1998; Vol. 160, pag. 2388-2392

Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; Vol. 374, No. 6522, pag. 6546-6549

Krieg AM, Wu T, Weeratna R, Efler SM, Love-Homan L, Yang L, Yi AK, Short D, Davis HL. Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by immunostimulatory CpG motifs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; Vol 95, No. 21, pag. 631-636

Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Ann Rev Immunol* 2002; Vol. 20, pag. 709-760

Krieg AM. Now I know my CpGs. *Trends Microbiol* 2002; Vol. 9, No. 6, pag. 249-252

Krieg AM. From A to Z on CpG. *Trends Immunol* 2002; Vol. 23, pag. 2, pag. 64-65

Kunkel SL, Chunsue SW, Strieter RM, Lynch JP, Remick DG. Cellular and molecular aspects of granulomatous inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1989; Vol. 1, pag. 439-448

Ladel CH, Blum C, Dreher A, Reifenberg K, Kopf M, Kaufmann SHE. Lethal tuberculosis in interleukin-6 deficient mutant mice. *Infect Immun* 1997; Vol. 65, pag. 4843-4849

Ladel CH, Szalay G, Reidel D, Kaufmann SHE. Interleukin-12 secretion by *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. *Infect Immun* 1997; Vol. 65, pag. 1936-1938

Lalvani A, Brookes R, Wilkinson R, Malin A, Pathan A, Nadersen P, Dockrell H, Pasvol G, Hill A. Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl. Acad Sci USA* 1998; Vol. 95, pag. 270-275

Laochumroonvorapong P, Wang J, Liu CC, Ye W, Moreira AL, Elkon KB, Freedman VH, Kaplan G. Perforin, a cytotoxic molecule which mediates cell necrosis, is not required for the early control of mycobacterial infection in mice. *Infect Immun* 1997; Vol. 65, pag. 127-132

Laochumroonvorapong P, Paul S, Manca C, Freedman VH, Kaplan G. Mycobacterial growth and sensitivity to H₂O₂ killing in human monocytes *in vitro*. *Infect Immun* 1997; Vol. 65, pag. 4850-4857

Lefford MJ. Transfer of adoptive immunity to tuberculosis in mice. *Infect Immun* 1975; Vol. 11, pag. 1174-1181

Lindquist S. The heat shock responses. *Ann Rev Biochem* 1986; Vol. 55; pag. 1151-1191

Lindquist S & Craig EA. The heat shock proteins. *Ann Rev Genet* 1988; Vol. 22; pag. 631-677

Lopez AD & Murray CCJL. The global burden of disease, 1990 – 2020. *Nat Med* 1998; Vol. 4, pag. 1241-1243

Loudon RG & Roberts RM. Droplet expulsion from the respiratory tract. *Am Rev Respir Dis.* 1967; Vol. 95, pag. 435-442

Lowrie DB, Tascon RE, Silva CL. Vaccination against tuberculosis. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; Vol 108, No. 4, pag. 309-312

Lowrie DB, Silva CL, Colston MJ, Ragno S, Tascon RE. Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. *Vaccine* 1997; Vol 15, No. 8, pag. 834-838

Lowrie DB, Silva CL, Tascon RE. DNA vaccines against tuberculosis. *Immunol Cell Biol* 1997; Vol 75, No 6, pag. 591-594

Lowrie DB, Silva CL, Tascon RE. Genetic vaccination against tuberculosis. *Springer Semin Immunopathol* 1997; Vol 19, No. 2, pag. 161-173

Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL, Lima VM, Faccioli LH, Stavropoulos E, Colston MJ, Hewinson RG, Moelling K, Silva CL. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* 1999; Vol 400, No 6741, pag. 269-271

Lurie M. Studies on the mechanisms of immunity in tuberculosis. The fate of tubercle bacilli ingested by mononuclear phagocytes derived from normal and immunized animals. *J. Exp. Med* 1942; Vol. 75, pag. 247- 267

Lyadova I, Yeremeev V, Majorov K, Nikonenko B, Khaidukov S, Kondratieva T, Kobets N, Apt A. An *ex vivo* study of T lymphocytes recovered from the lungs of I/St mice infected with and susceptible to *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1998; Vol. 66, pag. 4981-4988

Mackness G. The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activation *in vivo*. *J Exp Med* 1969; Vol. 129, No. 5, pag. 973- 992

Martins LP, Lau LL, Asano MS, Ahmed R. DNA vaccination against persistent infection. *J Virol* 1995; Vol. 69, pag. 2574-2582

McNeil MR & Brennan PJ. Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance; some thoughts and possibilities arising from recent structural information. *Res Microbiol* 1991; Vol. 142, pag. 451-463

Mazzaccaro RJ, Gedde M, Jensen ER, Van Santem HM, Ploegh HL, Rock KL, Bloom BR. Major histocompatibility class I presentation of soluble antigen facilitated by *Mycobacterium tuberculosis* infection. Proc Natl Acad Sci USA 1996; Vol. 93, pag. 11786-11791

Mohagheghpour N, Gammon D, Kawamura LM, Van Vollenhoven A, Benike CJ, Engleman EG. CTL response to *Mycobacterium tuberculosis*: identification of an immunogenic epitope in the 19 kDa lipoprotein. J Immunol 1998; Vol. 161, pag. 2400- 2406

Moncada S & Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. Eur J Clin Invest 1991; Vol. 21, No. 4, pag. 361-374

Moody DB, Ulrichs T, Muhlecker W, Young DC, Gurcha SS, Grant E, Rosaat JP, Brenner MB, Costello CE, Besra GS, Porcelli AS. CD1c-mediated T cell recognition of isoprenoid glycolipids in *Mycobacterium tuberculosis* infection. Nature 2000; Vol. 404, pag. 884-888

Morse D, Brothwell DR, Ucko PJ. Tuberculosis in ancient Egypt. Am Rev Resp Dis 1964; Vol. 93, pag. 524-530

Mossman TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I – Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol 1986; Vol 136, No. 7, pag. 2384-2357

Mustafa AS, Lundin KEA, Meloen RH, Shinnick TM. 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 Hsp60. *Immunology* 1996; Vol. 87, pag. 421-427

Mustafa AS, Lundin KEA, Meloen RH, Shinnick TM, 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* 1999; Vol. 67, pag. 5683-5689

Narain JP, Raviglione MC, Kochi A . HIV-associated tuberculosis in developing countries: epidemiology and strategies for prevention. *Tuberc Lung Dis* 1992; Vol. 73, pag. 311-321

Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon- γ as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med* 1983; 158: 670-679

Neill MA & Klebanoff SJ. The effect of phenolic glycolipid-1 from *Mycobacterium leprae* on the antimicrobial activity of human macrophages. *J Exp Med* 1988; Vol. 167, No. 1, pag. 30-42

North RJ. Importance of thymus-derived lymphocyte in cell-mediated immunity to infection. *Cell Immunol* 1973; Vol. 7, pag. 166-176

Oddo M, Renno T, Attainger A, Bakker T, MacDonald HR, Meylan PRA. Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1998; Vol. 160, pag. 5448-5454

O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 1998; Vol. 8, pag. 278-283

Olsen AW, Pinxteren LA, Okkels LM, Rasmussen PB, Andersen P. Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of Ag85B and ESAT-6. *Infect Immun* 2001; Vol 69, pag. 2773-2778

Orme IM. The kinetics of emergence and loss of mediator T lymphocytes acquired in response to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1987; Vol. 138, pag. 293-298

Orme IM, Miller ES, Roberts AD, Furney S, Griffen J, Chi D, Rivoire B, Brennan P. T lymphocytes mediating protection and cellular cytolysis during the course of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 1992; Vol. 148, pag. 189-196

Orme IM, Roberts AD, Griffen JP, Abrams JS. Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. J Immunol 1993; Vol. 151, No. 1, pag. 518-525

Orme IM. Prospects for new vaccines against tuberculosis. Trends Microbiol 1995; Vol 3, No. 10, pag. 169-185

Orme IM. Progress in the development of new vaccines against tuberculosis. Int J Tubercle Lung Dis 1997; Vol 1, No. 2, pag. 95-100

Orme IM, Cooper AM. Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis. Immunol Today 1999; 20: 307-312

Orme IM, McMurray DN, Belisle JT. Tuberculosis vaccine development: recent progress. Trends Microbiol 2001; Vol 9, No. 3, pag.115-118

Ottenhof TH, Kumararatne D, Casanova JL. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-1 cytokines in immunity to intracellular bacteria. Immunol Today 1998; Vol. 19, pag. 491-494

Pedrazzini T & Louis JA. Function analysis *in vitro* and *in vivo* of *Mycobacterium bovis* strain BCG-specific T cell clones. J Immunol 1986; Vol. 136, pag. 1828-1834

Pertmer TM, Roberts TR, Haynes JR. Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. *J. Virol* 1996; Vol. 70, pag. 6119-6125

Pollock JD, Williams DA, Gifford MA, Li LL, Du X, Fisherman J, Orkin SH, Doerschuk CM, Dinauer MC. Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat. Genet* 1995; Vol. 9, pag. 202-209

Porcelli A, Morita CT, Brenner MB. CD1b restricts the response of human CD4⁺ T lymphocytes to a microbial antigen. *Nature* 1992; Vol. 360, pag. 593-597

Porcelli AS & Modlin RL. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Ann Rev Immunol* 1999; Vol. 17, pag. 297-329

Porgador A, Irvine KR, Iwasaki A, Barber BH, Restifo NP, Germain RN. Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8⁺ T cells after gene gun immunization. *J Exp Med* 1998; Vol. 188, pag. 1075-1082

Raviglione MC, Dye C, Schmidt S, Kochi A. Assessment of worldwide tuberculosis control. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *Lancet* Vol. 350, pag. 624-629

Raz E, Carson DA, Parker SE, Parr TB, Abai AM, Aichinger G, Gromkowski SH, Singh M, Lew D, Yankauckas MA, Baird SM, Rhoades GH. Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; Vol. 91, pag. 9519-9523

Robinson HL, Boyle CA, Feltquate DM, Morin MJ, Santoro JC, Webster RG. DNA immunization for influenza virus: studies using hemagglutinin- and nucleoprotein-expressing DNAs. *J Infect Dis* 1997; Vol. 176, pag. S50-S55

Roman M, Martin-Orozco E, Goodman JS, Nguyen MD, Sato Y, Ronaghy A, Kornbluth RS, Richman DD, Carson DA, Raz E. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper 1- promoting adjuvants. *Nat Med* 1997; Vol. 3, pag. 849-854

Rook GAW, Champion BR, Steele J, Varey AM, Stanford JL. I-A restricted activation by T cell lines of anti-tuberculous activity in murine macrophages. *Clin Exp Immunol* 1985; Vol. 159, pag. 414-420

Riley RL, Mills CL, Nyka W, Weinstock N, Storey PB, Sultan LK, Riley MC, Wells WF. Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis: a two year study of contagion in a tuberculosis ward. *Am J Hyg* 1959; Vol. 70, pag. 185-196

Sakula A. Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. *Thorax* 1982; Vol. 37, No. 4, pag. 246-251

Salo WL, Aufderheide AC, Buikstra J, Holcomb TA. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; Vol. 91, No. 6, pag. 2091-2094

Saunders BM, Cooper AM. Restraining mycobacteria: Role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol Cell Biol* 2000; Vol. 78, pag. 334-341

Saunders BM, Frank AA, Orme IM, Cooper AM. Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun* 2000; Vol. 68, pag. 3322-3326

Schmidt S. A short history of tuberculosis. *Mod Asp Immunobiol* 2000; Vol. 1, No. 3, pag. 97

Schlesinger LS, Bellinger-Kawahara CG, Payne NR, Horwitz MA Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement

receptors and complement component C3. J Immunol 1990; Vol. 144, pag. 2771-2780

Schlesinger LS. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. J Immunol 1993; Vol. 150, pag. 2920-2930

Schlesinger LS, Hull SR, Kaufmann TM Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages. J Immunol 1994; Vol. 152, pag. 4070-4079

Schlesinger LS, Kaufmann TM, Iyer S, Hull SR, marchiaudo LK. Differences in mannose receptor-mediated uptake of lipoarabinomannan from virulent and attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* by human macrophages. J Immunol 1996; Vol. 157, pag. 4568-4575

Schorey JS, Carroll MC, Brown EJ. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria 1997; Vol. 277, No. 5329, pag. 1091-1093

Schuller-Levis GB, Levis WR, Ammazalorso M, Nosrati A, Parti E. Mycobacterial lipoarabinomannan induces nitric oxide and tumor necrosis factor alpha production in a macrophage cell line: down-regulation by taurine chloramine. Infect Immun 1994; Vol. 62, No. 10, pag. 4671-4674

Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Ann Rev Immunol* 1994; Vol. 12, pag. 635-673

Selwyn PA, Hartel D, Lewis VA, Schoenbaum EE, Vermund SH, Klein RS, Walker AT, Freidland GH. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *New Engl J Med* 1989; Vol. 320, pag. 545-550

Silva CL & Lowrie DB. A single mycobacterial protein (hsp65) expressed by a transgenic antigen-presenting cell vaccinates mice against tuberculosis. *Immunology* 1994; Vol 82, pag. 244-248

Silva CL, Silva MF, Pietro R, Lowrie DB. Protection against tuberculosis by passive transfer with T-cell clones recognizing mycobacterial heat shock protein 65. *Immunology* 1994; Vol. 83, pag. 341-346

Silva CL, Silva MF, Pietro RCLP, Lowrie DB. 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* 1996; Vol. 64, pag 2400-2407

Silva CL, Bonato VLD, Lima VMF. DNA encoding individual mycobacterial antigens protects mice against tuberculosis. *Braz J Med Biol Res* 1999; Vol 64, pag 231-234

Silva CL & Lowrie DB. Identification and characterization of murine cytotoxic T cells that kill *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2000; Vol. 68, No. 6, pag. 3269-3274

Silva CL, Bonato VLD, Lima KM, Coelho-Castelo AAM, Faccioli LH, Sartori A, De Souza AO, Leão SC. Cytotoxic T cells and mycobacteria *FEMS Microb Letters* 2001; Vol. 197, pag. 11-18

Snider DE & Castro KG. The global threat of drug resistant tuberculosis. *N Engl J Med* 1998; Vol. 338, pag. 1689-1690

Skinner MA, Yuan S, Prestidge R, Chuk D, Watson JD, Tan PL. Immunization with heat-killed *Mycobacterium vaccae* stimulates CD8+ cytotoxic T cells specific for macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1997; Vol. 65, pag. 4525-4530

Spencer DPS, Williams CSD, Hotchkiss JA, Davies PDO. Tuberculosis and poverty. *Thorax* 1992; Vol. 47, pag. 849P

Stenger S, Mazzaccaro R, Uyemura K, Cho S, Barnes P, Rosat J, Sette A, Brenner M, Porcelli S, Bloom B, Modlin R. Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science* 1997; Vol. 276, pag. 1684-1687

Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL et al
1994 Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion
of the vesicular proton-ATPase. Science Vol. 263, pag. 678-681

Tala E, Romanus V, Tala-Heikkila M. Bacille Calmette-Guérin vaccination in the
21st century. Eur Respir Mon 1997; Vol. 4, pag. 327-353

Tascon RE, Stavropoulos E, Lukacs KV, Colston MJ. Protection against
Mycobacterium tuberculosis infection by CD8 T cells requires production of
gamma interferon. Infect Immun 1998; Vol. 66, pag. 830-834

Teitelbaum R, Glatman-Freedman A, Chen B, Robbins JB, Unanue E, Casadevall
A, Bloom BR. A mAb recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis*
enhances host survival. Proc Natl Acad Sci USA 1998; Vol. 95, pag. 15688-15693

Teitelbaum R, Cammer M, Maitland ML, Freitag NE, Condeelis J, Bloom BR.
Mycobacterial infection of macrophages results in membrane-permeable
phagosomes. Proc. Natl. Acad Sci USA 1999; Vol. 96, pag. 15190-15195

Thole J, Van der Zee R. The 65 KDa antigen: molecular studies on a ubiquitous
antigen. In: MacFadden J (Ed). Molecular Biology of the mycobacteria. Surrey
University Press, 1990; pag. 37-68

Torres CA, Iwasaki A, Barber BH, Robinson HL. Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations. *J Immunol* 1997; Vol. 158, pag. 4529-4532

Turner OC, Roberts AD, Frank AA, Phalen SW, McMurray DM, Content J, Denis O, D'Souza S, Tangiie A, Iiuygen K, Orme IM. Lack of protection in mice and necrotizing bronchointerstitial pneumonia with bronchiolitis in guinea pigs immunized with vaccines directed against the hsp60 molecule of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2000; Vol 68, No. 6, pag 3674-3679

Ulmer JB, Deck RR, Dewitt CM, Donnhly JI, Liu MA. Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: antigen presentation by non-muscle cells. *Immunology* 1996; Vol. 89, pag. 59-67

Ulrichs T & Kaufmann SHE. Mycobacterial persistence and immunity. *Front Biosci* 2002; Vol. 7, pag. d458-469

Underhill DM, Ozinsky A Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Ann Rev Immunol* 2002; 20: 825-852

Underhill OM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor 2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; Vol. 96, No. 25, pag.14459-14463

Volpp BD, Nauseef WM, Clark RA. Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. *Science* 1988; Vol. 242, No. 4883, pag. 1295-1297

Yang NS, Burkholder J, Roberts B, Martinell B, McCabe D. In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; Vol. 87, pag. 9568-9572

Yokoyama M, Zhang J, Whitton JL. DNA immunization confers protection against lethal lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Virol* 1995; Vol. 69, pag. 2684-2688

Zarozinski CC, Fyan EF, Selin LK, Robinson HL, Welsh RM. Protective CTL-dependent immunity and enhanced immunopathology in mice immunized by particle bombardment with DNA encoding an internal virion protein. *J Immunol* 1995; Vol. 154, pag. 4010-4017

Zhu X, Stauss HJ, Ivanyi J, Vordermeier HM. Specificity of CD8⁺ T cells from subunit vaccinated or infected H-2b mice recognizing the 38 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int Immunol* 1997; Vol. 9, pag. 1669-

Wright SD, Silverstein SC Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J. Exp Med* 1983; Vol. 158, No. 6, pag. 2016-2023

Wolff JA, Ludtke JJ, Acsadi G, Williams P, Jani A. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet* 1992; Vol. 1, pag. 363-369

RESUMO

Tem sido recentemente demonstrado que a vacina pCDNA3-hsp65 apresenta atividade profilática e terapêutica na tuberculose experimental. Essa vacina é constituída do gene hsp65 *Mycobacterium leprae* e fragmento downstream de 1324 pb. Entretanto, uma investigação mais refinada da resposta imune desencadeada por diferentes fragmentos do inserto dessa vacina ainda não foi realizada. Também, não foi estudada, a influência do fragmento *downstream* ao gene hsp65 na indução da resposta imune pela vacina. Para tal propósito, foram construídos subclones da vacina pCDNA3-hsp65, com a colaboração da Dra. Sylvia Cardoso Leão (UNIFESP), para utilização nos esquemas de imunização e nos ensaios para avaliar a resposta imune humoral e celular. As novas construções de DNA foram denominadas pCDNA3-hsp65G (G = gene hsp65, para diferenciar da construção vacinal original, que contém gene hsp65 + fragmento downstream), pCDNA3-N (N = N-terminal da proteína Hsp65), pCDNA3-N59 (N59 = 59 pb codificante da extremidade N-terminal da Hsp65) e pCDNA3-DS (DS = downstream).

Camundongos BALB/c foram imunizados por via intradérmica (Gene Gun) ou via intramuscular, com 10 µg/dose ou 100 µg/dose, respectivamente. Foram feitas três imunizações com intervalo de 15 dias entre elas; 30 dias após a 3ª imunização, os animais foram sacrificados e a resposta imune foi avaliada. A resposta imune humoral foi avaliada pelos títulos de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a anti-Hsp65 através de ELISA. A resposta imune celular foi avaliada utilizando três

parâmetros: proliferação de células totais do baço e linfonodos inguinais por incorporação de timidina triciada, produção das citocinas IL-4, IL-10, IFN-gama e IL-12 Hsp65-específicas por ELISA e determinação do influxo de linfócitos B, linfócitos T CD4+ e CD8+, macrófagos e células dendríticas para o baço dos animais imunizados com as construções de DNA.

Por via intradérmica (Gene Gun), as imunizações com as construções a construção vacinal original pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G, construção contendo somente o gene hsp65 de *Mycobacterium leprae*, induziram elevados níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a anti-Hsp65. Essas construções também induziram resposta imune celular específica. Células totais do baço e linfonodos inguinais dos animais imunizados com pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G proliferaram significativamente na presença de Hsp65 recombinante. A produção das citocinas IL-10, IFN-gama e IL-12 antígeno específica foi elevada, caracterizando um perfil misto Th1/Th2, porém com tendência a resposta Th2. Esse dado corroborou com os elevados títulos de anticorpos IgG1 e IgG2a. Também verificou-se um aumento no influxo de macrófagos, células dendríticas, linfócitos B, linfócitos T CD4+ e T CD8+ no baço dos animais imunizados em relação aos grupos controles (pCDNA3 e não imunizado). Entretanto, a resposta imune humoral e celular desencadeada pela construção vacinal original pCDNA3-hsp65 foi maior que aquela induzida por pCDNA3-hsp65G. As construções pCDNA3-N, pCDNA3-DS e pCDNA3-N59 não induziram resposta imune específica.

Por via intramuscular, as construções pCDNA3-hsp65, pCDNA3-hsp65G e pCDNA3-N induziram elevados títulos de IgG, IgG1 e IgG2a anti-Hsp65,

proliferação celular e produção significativa das citocinas avaliadas e aumento do influxo de macrófagos, células dendríticas, linfócitos B, linfócitos T CD4+ e CD8+ em comparação com os controles (pCDNA3 e não imunizado). Um perfil Th1 de resposta é induzido por pCDNA3-hsp65, pCDNA3-hsp65G e pCDNA3-N, quando injetadas por via intramuscular, uma vez que elevados níveis de IFN-gama e IL-12, além de elevados títulos de IgG2a, foram detectados. Entretanto, não foram verificadas diferenças na ativação da resposta imune humoral e celular quando as construções pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G foram comparadas. A construção pCDNA3-N desencadeou resposta imune em menor magnitude que as construções pCDNA3-hsp65 e pCDNA3-hsp65G. As demais construções (pCDNA3-N59 e pCDNA3-DS) não foram imunogênicas.

Esses resultados indicaram que a ausência do fragmento *downstream* ao gene hsp65 interfere significativamente na ativação da resposta imune humoral e celular pela vacina, quando os animais foram imunizados por via intradérmica (Gene Gun) com pCDNA3-hsp65G, construção que não contém o fragmento *downstream*. Isso sugeriu que existe a provável participação de *motifs* CpG, presente no fragmento *downstream*, na indução da resposta imune, que foi significativamente diminuída quando esse fragmento foi retirado da construção de DNA pCDNA3-hsp65G. Por outro lado, por via intramuscular, o fragmento *downstream* parece não interferir no desencadeamento da resposta imune humoral e celular pela vacina. Essas diferenças na indução da resposta imune pelo fragmento *downstream* parecem estar diretamente relacionadas com a quantidade de DNA que é injetada nos animais e com a via de administração do DNA.

SUMMARY

Recently, it had been demonstrated that pCDNA3-hsp65 DNA vaccine has prophylactic and therapeutic activities in experimental tuberculosis. This vaccine contains hsp65 gene from *Mycobacterium leprae* and 1324 bp downstream fragment. However, an investigation more refined of immune response triggered by different fragments from vaccine insert was not performed. Also, the influence of 1324 bp downstream fragment to induce immune response was not studied. Thus, DNA constructs were engineered from pCDNA3-hsp65 vaccine. These new DNA constructs were called pCDNA3-hsp65G (G = hsp65 gene, to differ of pCDNA3-hsp65, that contain hsp65 gene and 1324 bp downstream fragment), pCDNA3-N (N = Hsp65 N-terminal), pCDNA3-N59 (N59 = 59 bp codifying Hsp65 N-terminal) e pCDNA3-DS (DS = downstream).

BALB/c mice were immunized by intradermal (Gene Gun) and intramuscular route, with 10 µg/dose and 100 µg/dose, respectively. Three immunizations were performed with 15 days between each one; 30 days after the last immunization, the mice were sacrificed and the immune response was evaluated. The humoral immune response was evaluated by anti-Hsp65 IgG, IgG1 and IgG2a antibody titles by ELISA. The cellular immune response was evaluated using three parameters: proliferation of spleen and lymph nodes cells by thimide tritiated incorporation, production of IL-4, IL-10, IFN-γ, IL-12 Hsp65- specific by ELISA and determination of B, T, T CD4+ and T CD8+ lymphocytes, macrophages and dendritic cells influx to spleen of the immunized mice.

By intradermal (Gene Gun) route, the immunizations with pCDNA3-hsp65 and pCDNA3-hsp65G induced high anti-Hsp65 IgG, IgG1 and IgG2a antibody titres. These DNA constructs also triggered specific cellular immune response. Spleen and lymph node cells from mice immunized with levels pCDNA3-hsp65 and pCDNA3-hsp65G proliferated significantly with recombinant Hsp65. The levels of IL-4, IL-10, IFN- γ and IL-12 antigen-specific was high, characterizing Th1/Th2 profile, but tending to Th2 response. These data correlated to high IgG1 and IgG2a antibody titres. Also, it was found that there is a influx of macrophages, dendritic cells and lymphocytes B, T, T CD4+ and T CD8+ into mice spleens in relation to control groups (pCDNA3 and non immunized). However, the humoral and cellular immune response were not evoked by pCDNA3-hsp65 was higher than that one triggered by pCDNA3-hsp65G. The pCDNA3-N, pCDNA3-NDS and pCDNA3-N59 did not induce specific immune response.

By intramuscular route, pCDNA3-hsp65, pCDNA3-hsp65G and pCDNA3-N induced high anti-Hsp65 IgG, IgG1 and IgG2a, cellular proliferation, significant cytokine levels and increase of macrophages, dendritic cells, lymphocytes influx comparing to controls (pCDNA3 and non immunized). Th1 response was evoked by these DNA constructs because it was detected high IFN- γ and IL-12 levels and IgG2a titres. It not found differences in humoral and cellular immune response evoked by pCDNA3-hsp65 and pCDNA3-hsp65G. The pCDNA3-DS and pCDNA3-N59 were not immunogenic.

These results indicated that the absence of downstream fragment interfere significantly in immune response activation, when mice were immunized by

intradermal route with pCDNA3-hsp65, construct that not contain downstream fragment. This suggest that there is a putative participation of CpG motifs, contained into downstream fragment, to induce immune response, that was decreased when this fragment was excised. By the other hand, by intramuscular route, the downstream fragment interfere in immune response triggering. It is believed that these differences in role of downstream fragment is related with DNA quantity injected into mice and administration route.