

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp

Faculdade de Medicina de Botucatu

Vacina gênica (DNAhsp65) para tuberculose em camundongos neonatos

Ana Cláudia Pelizon

Tese apresentada ao Programa de Pós – Graduação em
Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu
para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Alexandrina Sartori

Botucatu – SP

2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Sumário

Sumário

Introdução.....	1
Objetivos.....	17
Material e métodos.....	19
1. Animais	
2. Imunizações	
A. Vacina de DNA	
B. BCG	
3. Obtenção do plasmídeo.....	20
4. Obtenção de soros e sobrenadantes celulares	
5. Determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC).....	21
6. Citocinas em homogenato de pulmão	22
7. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	
A. Para dosagem de anticorpos	
B. Para dosagem de citocinas.....	23
8. Obtenção do RNA total.....	24
9. Distribuição tecidual do plasmídeo por RT-PCR.....	25
A. Tratamento com DNase I	
B. Síntese de cDNA fita simples	
C Amplificação do cDNA específico pela reação de PCR.....	26
9. Análises eletroforéticas em gel de agarose.....	27
10. Análise estatística	
Protocolos e Resultados.....	29

Protocolo experimental 1: Avaliar se a administração de diferentes doses da vacina DNAhsp65 no período neonatal induz tolerância.....	30
Resultados.....	31
Figura 1.....	32
Protocolo experimental 2: Avaliar a distribuição tecidual do plasmídeo administrado no período neonatal.....	33
Resultados.....	34
Figura 2.....	35
Figura 3.....	36
Figura 4.....	37
Tabela 1.....	38
Protocolo experimental 3: Avaliar se a vacina DNAhsp65 é imunogênica quando administrada integralmente (3 doses) no período neonatal.....	39
Resultados.....	
- Produção de IFN- γ	
- Produção de IL-4 e IL-5	
- Produção de IL-10.....	40
- Produção de anticorpos anti-hsp65.....	41
Figura 5.....	42
Figura 6.....	43
Figura 7.....	44

Figura 8.....	45
Protocolo experimental 4: Avaliar se a baixa imunogenicidade da vacina DNAhsp65 no período neonatal se deve a diferenças na produção de citocinas nestes períodos de imunização.....	46
Resultados.....	47
Figura 9.....	48
Figura 10.....	49
Figura 11.....	50
Protocolo experimental 5: Avaliar se esta baixa imunogenicidade está associada com indução de tolerância em alguns dos diferentes períodos de imunização.....	51
Resultados.....	52
Figura 12.....	53
Protocolo experimental 6: Avaliar a imunogenicidade da estratégia: BCG na fase neonatal seguida de DNAhsp65 na fase adulta.....	54
Resultados	
Produção de citocinas	
- Produção de IFN- γ	55
- Produção de IL-4	
- Produção de IL-5.....	56
- Produção de IL-10.....	57
- Produção de anticorpos anti-hsp65.....	58
Figura 13.....	59

Figura 14.....	60
Figura 15.....	61
Figura 16.....	62
Figura 17.....	63
Figura 18.....	64
Resultados.....	65
Figura 19.....	66
Figura 20.....	67
Protocolo experimental 7: Avaliar a eficácia protetora da estratégia BCG no neonato e DNAhsp65 no adulto.....	68
Resultados	
Produção de citocinas	
Unidades formadoras de colônia (CFU).....	69
Figura 21.....	70
Figura 22.....	71
Figura 23.....	72
Figura 24.....	73
Discussão	75
Referências bibliográficas	

Resumo

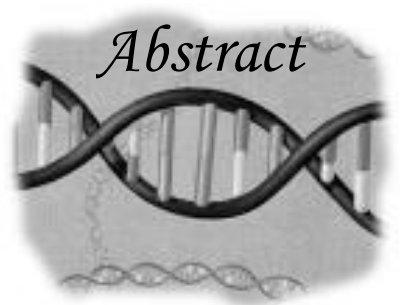


Resumo

O presente estudo foi proposto para investigar as características e a eficácia da resposta imune induzida pela vacina gênica para tuberculose em camundongos neonatos. Desta maneira, são objetivos específicos deste trabalho: avaliar se a imunização no período neonatal induz tolerância; determinar a presença de mensagem para hsp65, através de PCR, nos vários tecidos; caracterizar a resposta imune induzida por vacinação integral com DNAhsp65 no período neonatal; avaliar as características da resposta imune induzida pela estratégia BCG no período neonatal seguida de “boosters” com a vacina gênica no período adulto; avaliar a eficácia protetora da estratégia BCG / DNA. As avaliações foram feitas com células dos camundongos normais, injetados com PBS ou previamente imunizados e estimuladas *ex vivo* com *S. aureus*, LPS, rhsp65 ou ConA. Os sobrenadantes das culturas foram coletados após 48 h de incubação e as concentrações de IL-12p70, IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 foram determinadas por ELISA. A produção de anticorpos (IgG1 e IgG2a) foi avaliada no soro dos animais também pelo método de ELISA. A detecção de mensagem para hsp65 nos diferentes tecidos dos animais foi feita por RT-PCR. A infecção dos animais foi realizada por via intratraqueal e foram dosadas citocinas do homogenato dos pulmões, feita análise histopatológica e determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC). Nossos resultados mostram que a vacina DNAhsp65 não induziu tolerância nos neonatos; a imunização do neonato resultou em expressão da proteína no músculo; a vacina tem baixa imunogenicidade

quando administrada no neonato; o protocolo “prime-boost” (BCG / DNAhsp65) tem elevada imunogenicidade, mas não apresenta eficácia protetora; “priming” neonatal com DNAhsp65 ou BCG desencadeou resposta imune com perfil misto (Th1 / Th2).

Abstract



Abstract

DNAhsp65 is a genetic construction containing the gene coding for hsp65 from *M. leprae*. This vaccine induced protective immunity in adult BALB/c mice. As tuberculosis vaccine is administered very early in life, we tested the immune response induced by DNAhsp65 in newborn mice. Mice were immunized in young age (5, 12 and 19 days old) or primed as newborns (5 days old) with DNAhsp65. The presence of mRNA for hsp65 was tested in different tissue by RT-PCR and message was found in injected muscle but not in other tissues. The immune response was evaluated by the seric amount of anti-hsp65 antibodies and cytokine levels (IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10) in supernatants from splenic cell cultures stimulated with ConA or *S. aureus*. The results showed clearly that the vaccine is being transcribed in the muscle, that the protein is not inducing tolerance and that the induced immune response presents a mixed Th1 / Th2 pattern. The protective efficacy of BCG / DNA protocol, tested by challenge with *M. tuberculosis* by IT route, showed no protection by both, the number of CFU in lung homogenates and also by histopathological analysis of lung tissue.

Introdução



I. INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) é uma das principais causas de morte por doença infecciosa, sendo responsável por aproximadamente 1,7 milhões de mortes e 8,8 milhões de novos casos anualmente no mundo (OMS, 2005). No Brasil, o número anual de casos chega a 85 mil com ocorrência de 6 mil mortes / ano (Ministério da Saúde, 2005). A associação com o vírus HIV e a situação de extrema pobreza de alguns países em desenvolvimento são condições que propiciam o aumento desses índices (Abolhassani et al., 2000), tornando a TB a sexta maior causa de morte no mundo (Agger & Andersen, 2002).

A resposta imune contra o agente etiológico da doença, *Mycobacterium tuberculosis*, é predominantemente celular. A micobactéria invade o hospedeiro através das vias aéreas, infecta o pulmão e logo depois é internalizada pelos macrófagos alveolares, causando inflamação no tecido pulmonar. Dentro dos macrófagos, que são células com alto potencial microbicida, os bacilos tem a habilidade de desativar os sistemas de defesa dessas células e conseguem sobreviver e se multiplicar no seu interior. O sistema de defesa imunitário do homem toma conhecimento da presença dos bacilos e estabelece uma resposta contra os mesmos, caracterizada por uma reação inflamatória crônica denominada granuloma e que tem como finalidade conter o crescimento bacteriano e prevenir que a infecção se dissemine, porém também protege os microrganismos contra a resposta imune, mantendo-os em estado de latência (Goldsby et al., 2000). Nestas condições os bacilos podem sobreviver anos e o indivíduo infectado pode não desenvolver a doença, que se manifesta quando há um desequilíbrio dessa relação mútua e freqüentemente está associada com estados de queda da

resposta imunológica (Silva et al., 2001). Durante a resposta imune contra o patógeno os macrófagos têm papel fundamental, pois são responsáveis pelo processamento e apresentação de antígenos, uma vez que é dentro do fagossoma dessas células que o microorganismo fica dormente até voltar a replicar-se e causar a patologia. Além disso, têm função microbicida quando ativadas por IFN- γ , pois secretam produtos intermediários de oxigênio e nitrogênio, como íon superóxido e óxido nítrico (Macgregor et al., 1998), que têm efeito bactericida. Mecanismos como restrição de ferro, acidificação do fagossoma e fusão do fagossoma com os lisossomas também contribuem para a inibição do crescimento micobacteriano (Kaufmann et al., 2003).

Quatro populações de células T estão envolvidas na resposta imune contra o bacilo: TCD4+, TCD8+, T $\gamma\delta$ e T reconhecedoras de antígenos lipídicos apresentados por moléculas CD1 (T CD1 restritas). Todas elas são secretoras de IFN- γ e possuem propriedades citotóxicas (MacGregor et al., 1998). Os linfócitos T CD4+ são os maiores produtores de IFN- γ e de outras citocinas de perfil Th1 (IL-2, TNF- β). Acredita-se que estas células sejam as principais responsáveis pela proteção contra a infecção, pois o IFN- γ que secretam tem papel fundamental na ativação dos macrófagos, que são descritas como as principais células efetoras da resposta imune contra micobactérias (Liu, 2003). A participação das células TCD8+ contra a TB é uma descoberta mais recente. Capazes de lisar macrófagos infectados através da secreção de perforinas e granulinas, estas células liberam as bactérias intracelulares em estado latente dentro dos fagossomas, deixando-as suscetíveis ao ataque de macrófagos recém ativados (Silva et al., 2001; Liu,

2003). Os macrófagos infectados podem também, sofrer apoptose por interação com células T citotóxicas via Fas / FasL e liberar as micobactérias dormentes as quais serão fagocitadas e destruídas por outros macrófagos ativados (Silva et al., 2001). As células T $\gamma\delta$ possuem capacidade de responder ao antígeno micobacteriano denominado derivado protéico purificado (PPD). Assim como as células T CD8+, essas células também secretam perforinas e granulinas que agem diretamente sobre as micobactérias sem a presença dos macrófagos. Isto também ocorre com as células T CD1 restritas que são células que reconhecem glicolipídios da parede celular das micobactérias apresentados por moléculas CD1.

Atualmente existem vários medicamentos disponíveis para o tratamento da infecção, mas a prevenção continua sendo o método mais eficaz, já que o tratamento, por exigir um período longo (aproximadamente 6 meses), muitas vezes é interrompido pelo paciente; além disso, existem algumas cepas do bacilo que são resistentes às drogas anti-micobacterianas (Agger & Andersen, 2002).

A imunoprevenção é feita através da vacinação e a única preparação vacinal disponível contra TB é o bacilo de Calmette-Guérin (BCG), uma cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, que é recomendada pela OMS para todas as crianças com menos de um ano de idade. Anualmente, 100 milhões de recém-nascidos recebem essa vacina, considerada de fácil administração e também extremamente segura, pois 3 bilhões de doses já foram administradas com pouca incidência de efeitos colaterais (Abolhassani et al., 2000). Entretanto, é uma vacina que exige muitos cuidados no armazenamento e na conservação (Brooks et al., 2001); além

disso, seu efeito na proteção contra TB tem sido bastante controverso (Fine, 1995). Ensaio clínico revelou que a eficácia da proteção varia de zero a 80% nos diferentes países nos quais a vacina é empregada (Fine, 1995), e a imunidade induzida diminui em um período de 10 a 15 anos após a vacinação, deixando os indivíduos, quando adultos, praticamente desprotegidos contra a infecção (Kaufmann, 1990). A razão para essa falha na indução de proteção ainda está em estudo, mas hipóteses como diferenças entre cepas do bacilo (Kaufmann, 1990; Lee et al., 2000), via de inoculação (Abolhassani et al., 2000), idade da vacinação (Kaufmann, 1990) e influência de micobactérias ambientais (Kaufmann, 1990; Fine, 1995; Hernandez-Pando et al., 1997; Buddle et al., 2002) na resposta imune induzida pela vacina estão sendo avaliadas. Pesquisas recentes revelaram que a exposição às micobactérias ambientais mascara os efeitos da imunização subsequente com BCG (Kaufmann, 1990) e que esses microrganismos do meio ambiente mudam o perfil da resposta imune induzida pela vacina de Th1 para Th2 (Lee, et al., 2000).

Neste contexto é evidente a necessidade de desenvolvimento de uma nova vacina contra TB, igualmente ou mais segura que o BCG, de fácil administração para grandes populações e que induza, obviamente, ativação de uma resposta protetora. A vacina de DNA tem se mostrado uma candidata promissora para tanto, pois induz vários tipos de resposta imune sem provocar efeitos colaterais como aqueles das vacinas de microrganismos vivos atenuados.

As vacinas gênicas são construídas a partir da clonagem de genes ou fragmentos de genes, relacionados à virulência ou patogenicidade de microrganismos, em um plasmídeo bacteriano. Este plasmídeo é inserido em uma

bactéria, geralmente *Escherichia coli*, por transformação bacteriana. A bactéria, ao se replicar, permite que o plasmídeo se reproduza em larga escala, o que é fundamental para a produção da vacina (Goldsby et al., 2000). O vetor possui seqüência promotora ativa em mamíferos, seqüência sinal para finalização da transcrição, gene de resistência a antibiótico (que permite selecionar as bactérias que foram transformadas pela inserção do plasmídeo), origem de replicação, estabilizador da seqüência de mRNA e seqüências de nucleotídeos, chamadas de “motifs” CpG (citosina-fosfato-guanina não metiladas). Estas seqüências têm sido responsabilizadas pelo aumento da imunogenicidade deste tipo de vacina, pois estimulam a produção de citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-12 (Gurunathan et al., 2000; Liu, 2003). Também podem ser inseridos outros genes além daqueles que codificam o antígeno, como genes para síntese de citocinas ou expressão de moléculas co-estimulatórias, com o objetivo de melhorar a eficácia da vacina (Liu, 2003). Enfim, o plasmídeo pode ser modificado de maneira a desencadear resposta imune muito mais eficaz que as vacinas comuns, pois é extremamente versátil.

A entrada do plasmídeo nas células é denominada transfecção. Os métodos mais comuns para tanto são a transfecção *in vitro* de células somáticas e reimplantação dessas células no indivíduo, utilização de vírus ou bactérias modificados (não virulentos, incapazes de replicação) contendo o gene de interesse e capazes de inserir o material na célula e injeção com o próprio plasmídeo, chamado DNA nu (Gurunathan et al., 2000). Uma vez dentro do citoplasma, o DNA se desloca até o núcleo, onde o gene de interesse é transcrito,

produzindo o mRNA, que migra para o citoplasma, onde ocorre a síntese da proteína, que, no caso, é um antígeno (Liu, 2003). Um dos aspectos mais relevantes das vacinas gênicas é o fato de poderem, potencialmente, induzir tanto resposta imune humoral quanto celular, incluindo indução de TCD8+, o que normalmente se consegue somente com as vacinas vivas atenuadas. Isto ocorre porque a proteína sintetizada no organismo pode ser processada e apresentada tanto em associação com moléculas de MHC de classe II quanto I (Gurunathan et al., 2000).

Como a vacina gênica geralmente é administrada por via intramuscular, o miócito é a primeira célula que entra em contato com o material genético fornecido. Por não possuir moléculas co-estimulatórias, apesar de conseguir apresentar o antígeno processado, não é capaz de ativar os linfócitos T. Assim, o que se propõe é, que essa célula, após sintetizar o antígeno, libera-o no meio extracelular, onde uma célula apresentadora de antígeno (APC) o fagocita e apresenta com moléculas de MHC de classe II. Este mecanismo é chamado de “cross-priming”. Há outras hipóteses, menos aceitas, de que a própria APC sintetiza e apresenta o antígeno ou de que a célula muscular o faz (Liu, 2003).

Ensaio clínico com vacina gênica demonstraram segurança, avaliada pela não integração do DNA vacinal ao material genético da célula, não desenvolvimento de auto-imunidade e tolerância e eficácia na geração de resposta imune humoral e celular (MacGregor et al., 1998; Lee et al., 2000). Os diversos estudos indicam ampla distribuição do plasmídeo em camundongos, demonstrando que ocorre distribuição do mesmo para diferentes órgãos. De forma geral, a distribuição do plasmídeo variou em função da via de inoculação. Por

exemplo, em um modelo de estudo de distribuição tecidual e potencial de integração do DNA plasmidial em camundongos e cobaias empregando vacina de DNA codificando o gene E7 do papiloma vírus humano, por via intramuscular, foi observada presença do plasmídeo no músculo, pele do local de inoculação, linfonodos regionais e gônadas (Manam et al., 2000). Em outro estudo de localização tecidual e cinética de expressão plasmidial, utilizando inoculação por via intranasal, uma vacina de DNA codificando o gene env do vírus da Imunodeficiência Humana tipo I (HIV-I) mostrou presença do plasmídeo em alvéolo, pulmão, fígado, baço, linfonodos regionais, rim, feto e esôfago pela metodologia de FISH – hibridização *in situ* seguida de fluorescência (Tadokoro et al., 2001). Além disso, estudo com uma vacina contendo o gene Hev b 5 que codifica o alérgeno da *Hevea latex* administrada por via subcutânea, constatou presença do plasmídeo no local de inoculação, linfonodos, baço, pulmão, sangue e língua através de RT-PCR (Slater et al., 1998).

Estratégias para melhorar a eficácia dos protocolos vacinais vêm sendo investigadas e recentemente foi descrita uma metodologia denominada “prime-boost”, que consiste em uma pré-ativação (“priming”) do sistema imune com a vacina gênica contendo o antígeno de interesse, seguida por reforço (“booster”) com o mesmo antígeno inserido em um vetor viral ou bacteriano atenuado (Ramshaw & Ramshaw, 2000). Este tipo de estratégia vem sendo utilizada por alguns pesquisadores e tem se mostrado eficaz em gerar imunidade protetora em modelos animais e em humanos (Davis et al., 1996; Gonzalo et al., 2002; Pouniotis et al., 2004; Woodland, 2004). Schneider et al. (1998), utilizaram essa estratégia em modelo murino de malária demonstrando que o uso consecutivo de

DNA e vetor MVA (modified vaccinia vírus Ankara) codificando antígenos de *Plasmodium (P.) berghei* induziu altos níveis de IFN- γ secretado por células T CD8+ que protegeu os camundongos contra o desafio com esporozoítos de *P. berghei*.

Protocolos alternativos para “prime-boost”, envolvendo vacinação inicial com o vetor recombinante seguida de reforço com a proteína relevante têm mostrado resultados tanto protetores (Letvin et al., 1997) quanto não protetores (Excler & Plotkin et al., 1997).

Pesquisadores do Centro de Pesquisas em Tuberculose da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CPT – FMRP / USP) têm investigado o uso de uma vacina gênica para o controle da TB. A construção estudada contém o gene que codifica a proteína de choque térmico de 65 kDa, hsp65, de *Mycobacterium leprae*. As hsps são proteínas celulares abundantes em organismos eucarióticos e procarióticos, funcionam como chaperonas e, em situações de estresse, sua produção aumenta. São capazes de sensibilizar o hospedeiro imunologicamente, pois são processadas e apresentadas como antígenos (Kaufmann, 1990). A hsp65 das micobactérias demonstrou ser bastante imunogênica (Kaufmann et al., 1991). Entretanto, a imunização com a proteína, mesmo com adição de adjuvantes, não se mostrou eficiente para a indução de resposta imune protetora (Bonato et al., 1999). Alternativamente, quando clonada em vetores plasmidiais foi capaz de induzir proteção, demonstrada pela produção de IFN- γ e diminuição significativa do número de bacilos nos pulmões de camundongos experimentalmente

infectados (Lowrie et al., 1999). Assim, a imunização gênica com hsp65 mostra-se promissora no que se refere ao desenvolvimento de novas vacinas contra TB.

Dentro desse contexto, a imunização de recém-nascidos merece um destaque especial, pois a maioria das vacinas, incluindo BCG, é administrada nos primeiros meses de vida. Porém, a imunização de neonatos nem sempre produz os resultados esperados, pois o sistema imune do neonato é qualitativa e quantitativamente diferente do adulto.

As diferenças entre o sistema imune do adulto e do neonato podem ser observadas nos componentes da imunidade inata, nas APCs e nos linfócitos B e T. Os PMN dos neonatos, por exemplo, apresentam capacidade de aderência, atividade quimiotática e enzimática reduzidas. Deficiências também ocorrem ao nível dos monócitos / macrófagos, sistema complemento e citotoxicidade associada com células NK e outras células (Kovarik & Siegrist, 1998). Estas atividades killer permanecem inferiores às do adulto mesmo após estimulação com IL-12 ou IL-15 (Qian et al., 1997). Células dendríticas (CD) obtidas de cordão umbilical são menos eficazes do que CD de adultos em desencadear a proliferação de células T em resposta à estimulação antigênica. Isto poderia ser atribuído à expressão reduzida de moléculas de MHC, co-estimulatórias ou de adesão. Aumentos na concentração do mitógeno ou no número das CD na cultura ou ainda adição de IFN- γ tem permitido restauração da função de CD no neonato (Hunt et al., 1994). A fenotipagem comparativa de células T de cordão umbilical e de sangue periférico de adulto indica que no neonato as células T estão todas em um estado não ativado (virgens ou "naive"), enquanto que no adulto pelo menos

50% das células T são de memória. A importância deste achado reside no fato das células T virgens requererem períodos mais prolongados de estimulação via TCR. A expressão do ligante de CD40 também está diminuída nos linfócitos T do neonato. A produção de citocinas tais como GM-CSF, M-CSF, IL-12 e IL-15 no neonato só atinge por volta de um terço dos níveis produzidos pelo adulto (Buzby et al., 1996).

Aceita-se, atualmente, que as células T neonatais sejam imunocompetentes mas que sua diferenciação seja preferencialmente direcionada para o perfil Th2 sob condições neutras (Kovarik & Siegrist, 1998). Não está esclarecido se esta tendência Th2 é determinada pela produção de citocinas tipo Th2 durante a gravidez, se é devida às características da interação APC / célula T neste período ou se a ambos os fatores.

Estudos da função de células T *in vivo* são feitos principalmente empregando modelos animais. A indução de Th1 e Tc CD8+ em camundongos jovens requer procedimentos que incluem adjuvantes indutores de Th1 (Forsthuber et al., 1996) ou agentes com capacidade de replicação. É possível que agentes com estas características, como é o caso também das vacinas de DNA, aumentem o nível de ativação das APCs. No caso das vacinas gênicas não ocorre replicação, mas sim uma produção prolongada do antígeno.

Várias evidências têm demonstrado que células B de neonatos são fenotípica e funcionalmente diferentes das B de adultos, observando-se que a interação com o receptor para antígeno nas células B induz ativação e proliferação em células B maduras, mas não em células B de neonatos (Kovarik & Siegrist,

1998). Este defeito tem sido atribuído à transdução de sinais negativos, os quais inibem respostas subseqüentes para antígenos ou mitógenos e também tornam as células B mais propensas a sofrer apoptose.

Esta imaturidade do sistema imunológico no período neonatal tem sido atribuída ao fenômeno conhecido como “tolerância neonatal”. O conceito de tolerância imunológica e a demonstração deste fenômeno se devem a Burnet e Medawar, respectivamente (Billingham, et al., 1953). Entretanto, mais recentemente, alguns grupos de pesquisadores vêm reinterpretando este dogma imunológico, sugerindo que o sistema imune do neonato, de forma semelhante ao do adulto, pode ser primado para reconhecer e atacar agentes estranhos desde que o contato entre o antígeno e o sistema imune do neonato ocorra em condições adequadas. Estas idéias culminaram com uma nova teoria: a teoria do perigo formulada por Ridge et al. (1996). Segundo estes autores, o sistema imune pode aprender a tolerar antígenos a qualquer momento, não havendo um período crítico para distinguir entre o próprio e o não próprio. O que vai definir se deve ocorrer uma resposta ou uma tolerância imunológica é justamente o fato do antígeno representar ou não perigo para o organismo, ou seja, causar ou não lesão.

Devido aos aspectos já citados, neonatos respondem pobremente à vacinas convencionais e infecções microbianas, entretanto, várias evidências demonstram que em certas condições, a administração de antígenos pode desencadear resposta imune. Por exemplo, no caso de administração de vacinas de DNA em neonatos, é mais comum que ocorra desenvolvimento de imunidade do que tolerância (Bot & Bona, 2002).

Existem diferenças na magnitude e qualidade da resposta imune desenvolvida por neonatos e adultos em resposta à vacinação com DNA. Além disso, a magnitude da resposta imune do neonato em resposta às vacinas de DNA, também é menos intensa do que a dos adultos. O resultado da interação entre as vacinas gênicas e o sistema imune imaturo do neonato só mais recentemente começou a ser desvendado. No que concerne à indução de tolerância, as investigações têm demonstrado sua ocorrência no caso da utilização da vacina gênica empregando antígeno do circunsporozoíta da malária (Mor et al., 1996). O mecanismo de indução desta tolerância não está claro, variáveis que incluem local, quantidade, duração ou processamento e apresentação de antígeno por moléculas de MHC podem estar envolvidas. Camundongos imunizados entre 2 – 5 dias apresentaram tolerância que persistiu por mais de 9 meses, no entanto, a mesma vacina não induziu tolerância quando administrada em camundongos com mais de 2 semanas de idade. Por outro lado, estes fenômenos de tolerância não foram observados quando vacinas gênicas para outros agentes infecciosos (vírus da gripe e hepatite B) foram utilizadas (Bot et al., 1997; Watts et al., 1999).

Outro aspecto importante ao qual fizemos referência anteriormente é o fato dos neonatos não montarem uma resposta imune Th1 significativa, a não ser que fortes adjuvantes Th1 sejam utilizados (Pertmer et al., 2001). Na ausência destes promotores de Th1, os neonatos montam uma resposta direcionada para o sentido Th2 (Barrios et al., 1996). As vacinas gênicas, talvez pela existência de sequências CpG, parecem induzir resposta Th1 em neonatos. Segundo Bot & Bona (2002), um dos fatores responsáveis pela melhor imunidade do neonato em resposta às vacinas de DNA, seriam as sequências CpG. A capacidade dessas

sequências em ativar APCs parece ser fundamental para a imunogenicidade das vacinas de DNA em neonatos. A co-inoculação de sequências CpG com antígeno de superfície do vírus da hepatite B associado com alúmen em camundongos recém-nascidos foi seguida de indução de resposta imune, similar a obtida pela imunização com DNA.

A indução de Tc têm sido descrita como uma das grandes vantagens destas vacinas na profilaxia contra parasitas intracelulares. Esta indução é evidente em animais adultos. Em neonatos, Martinez et al. (1997), demonstraram que uma única imunização na primeira semana de vida com DNA expressando antígeno viral (hemaglutinina de vírus do sarampo e nucleoproteína do vírus Sendai) ou bacteriano (fragmento C da toxina tetânica) pode induzir uma resposta Tc significativa. Sarzotti et al. (1997) também observaram resposta Tc forte e duradoura em camundongos neonatos imunizados com DNA codificando a região envelopada de um retrovírus murino.

Trabalhos recentes sugerem que as vacinas gênicas induzem memória duradoura em animais adultos (Bot & Bona, 2002; Hassett et al., 2000). Em relação aos neonatos, Bot et al. (2001), testaram a capacidade de um protótipo de vacina de DNA contra o vírus da Influenza em primar para uma imunidade duradoura quando administrada em primatas recém-nascidos. A subsequente exposição ao vírus, determinou aumento significativo nas respostas humoral e celular em primatas primados com a vacina de DNA enquanto neonatos. Esta vacinação desencadeou memória imunológica que persistiu após a infância.

Por ser uma abordagem nova, vários aspectos moleculares relativos às vacinas gênicas ainda não foram totalmente esclarecidos. Por exemplo, a distribuição do plasmídeo e da proteína nos diferentes tecidos, e a possível integração deste plasmídeo no genoma das células hospedeiras. Estes aspectos vêm sendo estudados em animais adultos (Nichols et al., 1995; Gilkeson et al., 1996), mas não existem relatos concernentes a neonatos.

Neste contexto, temos uma preparação vacinal que representa um grande desafio a ser esclarecido cientificamente: uma vacina gênica para TB cuja resposta imune protetora precisa ser Th1 a ser administrada em fase inicial do desenvolvimento quando predomina uma resposta tipo Th2. Assim, pretendemos avaliar quais são as características da resposta imune induzida pela vacina DNAhsp65 em camundongos neonatos, em especial queremos determinar se a imunização integral ou iniciada no período neonatal induz resposta imune predominantemente Th1, a qual é protetora na TB experimental.



II. OBJETIVOS DO PROJETO

Objetivo Geral:

Avaliar as características e a eficácia da resposta imune induzida pela vacina gênica para tuberculose em camundongos neonatos.

Objetivos específicos:

1. Avaliar se a imunização no período neonatal induz tolerância (a ser caracterizada no animal adulto);
2. Determinar a presença de mensagem para hsp65, através de PCR, nos vários tecidos;
3. Caracterizar a resposta imune induzida por vacinação integral com DNAhsp65 no período neonatal (se é Th1, Th2 ou mista);
4. Avaliar as características da resposta imune induzida pela estratégia: BCG no período neonatal seguida de boosters com a vacina gênica no período adulto (estratégia BCG / DNA);
5. Avaliar a eficácia protetora da estratégia BCG / DNA.

Material e Métodos



III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c, machos e fêmeas (n = 4 - 8 animais) com 5 até 19 dias de idade (neonatos e jovens) ou com 5 - 6 semanas de idade (adultos). Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu.

2. Imunizações

A. Vacina de DNA

Os plasmídeos pVax e pVaxhsp65 purificados foram diluídos em PBS e suas concentrações acertadas para 2 µg/µl. A estas soluções acrescentou-se sacarose (concentração final de 10 - 12%). Cada animal adulto recebeu 100 µl de preparação vacinal, contendo 100 µg de DNA, administrada no músculo quadríceps. Os animais neonatos e jovens receberam 20µl de preparação vacinal contendo 50µg de DNA não acrescida de sacarose.

B. Estratégia BCG / DNA

Camundongos BALB/c neonatos (5 dias) foram imunizados com uma dose de BCG (10^5 / animal), por via intradérmica. A vacina foi fornecida pela Divisão de Imunizações do Núcleo de Vigilância Epidemiológica do HC – UNESP. Na fase adulta esses animais receberam 2 doses de vacina gênica como descrito acima.

3. Obtenção do plasmídeo

A vacina foi obtida a partir do crescimento da bactéria *E. coli* transformada com o plasmídeo e cultivada em meio LB com ampicilina (100 µg / ml) durante uma noite, a 37°C, em agitador a 200 rpm. Após o crescimento, a massa de bactérias foi sedimentada por centrifugação a 10.000 g por 5 minutos e a purificação dos plasmídeos realizada de acordo com o protocolo descrito no kit Maxiprep (Gibco). Ao sedimento formado foram adicionados 10 mL do tampão de suspensão contendo RNase A e 10 mL de solução de lise, seguindo-se de incubação a temperatura ambiente por 5 minutos (mantendo a solução a 37°C). Após esse período, foram adicionados 10 mL de solução alcalina (solução de neutralização), invertendo cuidadosamente e incubando por mais 10 minutos. Em seguida, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos, a 15.000 g. O sobrenadante foi, então, transferido para um novo tubo e aplicado em coluna de afinidade previamente equilibrada com tampão específico. A seguir, a coluna foi lavada e o DNA eluído. A essa etapa seguiu-se a adição de 15 mL de isopropanol ao eluato e centrifugação por 30 minutos a 28.000 g. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento formado foi adicionado 1 mL de tampão TE. O DNA obtido foi quantificado no GENE QUANT (Pharmacia Biotech) e, em seguida, alíquotas do DNA foram digeridas para posterior análise da integridade do DNA em gel de agarose 0,8%.

4. Obtenção de soros e sobrenadantes celulares

Amostras de soro foram obtidas por punção retro-orbital no período pré-imune e após as imunizações. Os níveis de anticorpos anti-hsp65 (IgG2a e IgG1) foram determinados através da técnica de ELISA, descrita no item 9. Sobrenadantes de

células esplênicas foram obtidos segundo a metodologia descrita a seguir. Após o sacrifício dos animais, os baços foram retirados, divulsionados, as suspensões celulares lavadas com RPMI incompleto e o sedimento celular coletado através de centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos. O número de células foi ajustado para 5×10^6 células / ml em meio RPMI 1640 contendo penicilina (100.000 U / ml) e 10% de soro bovino fetal. Em seguida, as células foram distribuídas em placas de 48 poços (1 mL). Posteriormente, foram adicionados diversos estímulos: LPS (5 μ g / ml de cultura); ConA (5 μ g / ml de cultura); *S. aureus* (1 / 5000 – v / v) e rhsp65 (10 μ g / ml de cultura). Após 48 horas de incubação a 37°C em ambiente contendo 5% de CO₂, os sobrenadantes foram coletados e estocados a -20°C para posterior dosagem de citocinas.

5. *Mycobacterium tuberculosis*

A linhagem virulenta Rv (H37Rv – ATCC – 29.294) de *Mycobacterium tuberculosis* foi mantida em meio de cultura líquido Middlebrook 7H9 enriquecido com ADC (BD Biosciences, SPARKS, USA) à 37°C, durante 10 dias. Após esse período a cultura foi repicada em meio sólido Lowenstein-Jensen (DIFCO Laboratories, Detroit, MI - USA) e mantida por 28 dias, sendo, posteriormente, mantidas à -70°C. Todos os procedimentos envolvendo o bacilo foram realizados em laboratório de segurança nível III.

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

A preparação do inóculo de *M. tuberculosis* H37Rv para a infecção experimental foi obtida a partir de uma alíquota congelada à -70°C. Duzentos microlitros da alíquota foram distribuídos em 10 ml de meio Middlebrook 7H9 enriquecido com ADC e a cultura

incubada por 7 dias à 37°C. A suspensão de micobactérias foi centrifugada e a massa obtida ressuspensa em 2 ml de PBS estéril e agitada vigorosamente por 2 a 3 minutos em tubo contendo pérolas de vidro. A viabilidade do inóculo foi testada com diacetato de fluoresceína (SIGMA) e brometo de etídeo (SIGMA) segundo McDonough & Kress (1995). Foram utilizadas alíquotas com viabilidade superior a 85%. 50 µl da alíquota foram semeados em meio Lowenstein – Jensen e incubados a 37°C por 20-30 dias. Uma alça dessa cultura foi adicionada a 10 ml de meio 7H9 e incubada a 37°C por 7-10 dias. A viabilidade foi novamente verificada e o número da bacilos na suspensão foi determinado através da densidade óptica da cultura a 540 nm. A suspensão foi centrifugada a 3500 rpm por 20 minutos e o sedimento ressuspensa em 1 ml de solução salina estéril e agitado vigorosamente em tubo cônico com pérolas de vidro estéreis por 2 minutos.

7. Infecção por via intratraqueal

A infecção intratraqueal foi realizada de acordo com Medeiros et al. (2004). Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com 2,2,2 – Tribromoetanol 99% (ACROS, New Jersey, USA), na concentração de 2,5% em PBS, na dose de 250 mg / animal. Os animais tiveram suas traquéias expostas e foram injetados 100 µl da suspensão contendo 1×10^6 bacilos / ml (1×10^5 bacilos / animal).

8. Determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC)

Animais infectados imunizados ou não com a vacina gênica foram sacrificados após 30 dias da infecção e tiveram seus pulmões retirados e pesados em placa de Petri

contendo meio RPMI - 1640 incompleto (Sigma). Após a pesagem, o terceiro lóbulo do pulmão direito foi fragmentado e transferido para um tubo contendo RPMI acrescido de liberase (0,5 µg/ml) (Sigma St Louis, MO) e incubados durante 30 min a 37°C. A suspensão celular obtida foi homogeneizada utilizando-se o aparelho Omni-Mixer, centrifugado a 1500 rpm por 10 min e o sobrenadante desprezado. A partir de uma alíquota de 100µl do pulmão digerido foram feitas diluições em PBS de 10, 100, 1000 e 10000 vezes. 100µl das diluições foram plaqueados em meio sólido 7H11 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) acrescido de ágar bacteriológico (Difco), plaqueando-se 50µl em cada lado da placa. As placas foram vedadas e incubadas a 37°C por 28 dias. Após o período de incubação, as colônias de micobactérias foram contadas com auxílio de lupa. O número de colônias foi corrigido de acordo com as diluições e peso dos pulmões e expresso em \log_{10} do número de UFC / pulmão.

9. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

A. Para dosagem de anticorpos

Placas de poliestireno (Nunc) de 96 poços foram inicialmente sensibilizadas com a proteína hsp65 recombinante: (5 µg/ml) diluída em tampão carbonato / bicarbonato de sódio 0,05M, (pH 9,6) e incubadas durante uma hora, a 37°C. Posteriormente, as placas foram lavadas e incubadas com PBS contendo 0,25% BSA e 0,05% Tween 80 (Difco Laboratories) durante 1 hora, em temperatura ambiente. A essa etapa seguiu-se a adição das amostras, incubando-se por 1 hora a 37°C. Após novas lavagens, os anticorpos conjugados à biotina, diluídos 1:1000, foram adicionados: anti-IgG1 e anti-IgG2a de camundongo (PharMingen). As placas foram incubadas por 1 hora, a 37°C. A

reação foi então revelada com o substrato OPD[®] (ortho-phenilenodiamina) e bloqueada adicionando-se ácido sulfúrico 16%. A leitura da absorbância foi realizada em 490nm em leitor de ELISA.

B. Para dosagem de citocinas em sobrenadantes

Os níveis de IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10 e IL-12p70 foram avaliados utilizando os pares de anticorpos (captura e revelador) especificados abaixo:

Citocina	Anticorpo de captura	Anticorpo revelador
IFN- γ	AN18	C15.16
IL-4	11B11	BVD6-24G2
IL-5	TRKF5	TRFK4
IL-10	JES5-2A5	SXC-1
IL-12p70	9A5	C17.8

Placas de 96 poços (Nunc) foram recobertas com solução contendo anticorpo purificado de captura anti-IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10 ou IL-12p70 de camundongo (PharMingen), diluídos 1:1000 em tampão fosfato de sódio (pH 9.0). As placas foram incubadas a 4°C, durante 12 h. Após 5 lavagens com solução PBS – Tween 20 (0.05%), foi adicionada a solução de bloqueio, constituída de PBS com 10% de soro bovino fetal, com incubação por 1 hora, a temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e incubadas durante 12 h, a 4°C, com as amostras e com as respectivas curvas de citocinas, diluídas na base 2 em tampão PBS contendo 10% soro bovino fetal e

0.05% de Tween 20. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram lavadas e incubadas com os anticorpos anti-IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10 ou IL-12p70 biotinizados, diluídos 1:1000 em tampão PBS contendo 10% de soro bovino fetal e 0.05% de Tween 20, durante 1 hora, a temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram incubadas com a solução AB (estreptoavidina + peroxidase) durante 30 minutos, a temperatura ambiente. As placas foram lavadas e reveladas com OPD, a reação foi interrompida por adição de H₂SO₄ 16% e a leitura realizada em 490 nm.

C. Para dosagem de IFN- γ em homogenato de pulmão

Para a quantificação de IFN- γ presentes no pulmão dos animais imunizados e desafiados, foram coletados os lóbulos superior e inferior esquerdos e transferidos para um tubo contendo meio RPMI-1640 incompleto, pesados e armazenados a -20°C. Os lóbulos foram descongelados e homogeneizados no aparelho Omni-mixer, centrifugados a 3500 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -70°C para posterior detecção de IFN- γ por ELISA.

10. Obtenção de RNA total

RNA total de vários tecidos (medula óssea, timo, baço, linfonodos, músculo, rim, fígado, coração, pâncreas e pulmão) dos animais imunizados com pVaxhsp65 ou injetados só com o vetor pVax foi obtido utilizando-se o reagente TRIzol® (Gibco BRL). Foi usado 1 ml de TRIzol para 50 -100 mg de tecido. As amostras de tecidos foram colocadas diretamente no trizol e homogeneizadas utilizando-se o aparelho Omni-Mixer

antes de proceder a extração do RNA total. As células da medula óssea foram inicialmente recuperadas através da perfusão da medula óssea do fêmur com RPMI incompleto, com auxílio de seringa de Mantoux. A amostra foi centrifugada a 1500 rpm durante 5 minutos e o precipitado celular ressuspensão diretamente em TRIzol e posteriormente processado para obtenção do RNA total.

As amostras homogeneizadas foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Adicionou-se 200 µl de clorofórmio para cada ml de TRIzol e o material foi agitado vigorosamente por 15 segundos e mantido por 3 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12000 g a 4°C durante 15 minutos. Após a centrifugação, a fase aquosa (sobrenadante) foi cuidadosamente recuperada, transferida para um novo tubo e o RNA precipitado pela adição de 500 µl de isopropanol. Após 10 minutos a -20°C, o material foi centrifugado a 12000 g, durante 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi removido e 1 ml de etanol foi adicionado ao pellet. A amostra foi homogeneizada manualmente e centrifugada a 7500 g por 5 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuspensionado em 20-60 µl de água livre de RNase e Dnase (Gibco BRL) e a quantidade de RNA total presente nas amostras quantificadas pelo GeneQuant II (Amersham-Pharmacia).

11. RT-PCR para detecção de mensagem para hsp65

A. Tratamento com DNase I

Antes da síntese da fita simples de cDNA, o RNA total (1-10 µg) obtido como descrito acima, foi tratado com a enzima *Amplification grade* DNase I (Gibco BRL) na presença de tampão contendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl e 2 mM de

MgCl₂. Utilizou-se 1 unidade da enzima para cada µg de RNA. A reação foi mantida por 15 minutos a temperatura ambiente, seguida da adição de 1 µl de EDTA a 25 mM e inativada a 65°C por 15 minutos adicionais. Esse material foi usado para a obtenção de cDNA fita simples. O controle da transcrição foi realizado com 1 - 3 µl do material tratado com DNase I.

B. Síntese de cDNA fita simples

O material obtido do tratamento com DNase I foi utilizado para a síntese de cDNA fita simples com a *SuperScript™ II* (Gibco BRL). Para cada 5 µg de RNA total foi adicionado 1 µl de oligo (dT)₁₂₋₁₈ [500 µg/ml] (Gibco BRL) e 1 µl da mistura de dNTP a 10 mM. A mistura foi mantida por 10 minutos a 70°C e, em seguida, em gelo por 2 minutos. Adicionou-se tampão da enzima (concentração final: 50 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂ e 0,02 mM de DTT). O material foi equilibrado a 42°C por 2 minutos e incubado com 1 µl (200 U) de *SuperScript™* durante 50 minutos a 42-45°C. A reação foi inativada pela incubação a 70°C por 15 minutos e o material obtido utilizado para amplificação do cDNA específico.

C. Amplificação do cDNA específico pela reação de polimerização em cadeia (PCR)

Aproximadamente um décimo do material fita simples foi utilizado como molde para amplificação do cDNA específico. A reação (50 µl) foi conduzida na presença de 2,5 unidades da *Taq* DNA polimerase (Gibco BRL), 0,2 mM de cada dNTP, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl e 1,5 mM de MgCl₂. Os pares de *primers* utilizados

para a amplificação da hsp65 foram: primer interno da região 5' da hsp65: 5'-ACCAACGATGGCGTGTCCAT - 3' e primer comercial BGH da região 3' do pcDNA3: 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3', que amplificam banda de 400 pares de base. Os pares de *primers* para a β -actina foram: 5'GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA 3' e 5'CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC 3'.

Os *primers* foram utilizados na concentração de 10 pmoles. A reação foi incubada em um termociclador PTC-100™ (MJ Research, Inc.) por 3 minutos a 95°C, e, em seguida, submetida a 35 ciclos de amplificação com desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 61°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 90 segundos. Seguiu-se uma extensão final de 10 minutos a 72°C e o material obtido foi analisado em gel de agarose. A amplificação do cDNA controle para hsp65 por PCR foi realizada nas condições descritas acima utilizando-se 100 ng do DNA plasmideal como molde. Esta amplificação foi feita para avaliar a presença de DNA genômico contaminante nas amostras de RNA total.

12. Análise eletroforética em gel de agarose

A análise do DNA amplificado foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1 ou 0,8 % (temperatura ambiente) no sistema Mini-Sub™DNA Electrophoresis cell (7,5 x 5,0 cm) (Bio-rad Laboratories Inc, Hercules, USA). As amostras foram ressuspendidas em tampão de eletroforese 6 vezes concentrado (0,25 % azul de bromofenol; 40 % de sucrose em água) e o material submetido a eletroforese em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM pH 8,3). As corridas eletroforéticas tiveram duração aproximada de 2 - 3 horas (50 V, 25 mA). As bandas de DNA foram

visualizadas no gel, sob luz ultravioleta após a coloração com 0,5 µg/ml de brometo de etídio (Gibco BRL) e o gel fotografado pelo sistema ImageMaster™ VDS (Pharmacia LKB) ou com filmes Polaroid® (Polaroid Corporation, Cambridge, USA).

13. Processamento histológico dos pulmões

Os lóbulos superiores direito dos pulmões dos animais foram removidos após 30 dias da infecção. Os tecidos foram fixados por 24h em tampão de Millonig (10% formaldeído – Sigma ST. Louis, MO, USA; 1,86% de fosfato de potássio monobásico e 0,42% de hidróxido de sódio – Merck, Montreal, Canadá, pH=7,4). As amostras fixadas foram desidratadas em séries de etanol e inclusas em resina de metacrilato glicol (Kit Leica de historesina). Cortes histológicos com 3 µm de espessura foram corados com hematoxilina – eosina (HE) e analisados comparativamente os componentes celulares e organização tecidual pulmonar dos animais dos diferentes grupos.

14. Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados empregando-se o programa Graph Pad Software (San Diego, CA, USA, 1993). Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA), seguida de comparação pelo método de Tukey. Valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Protocolos e Resultados

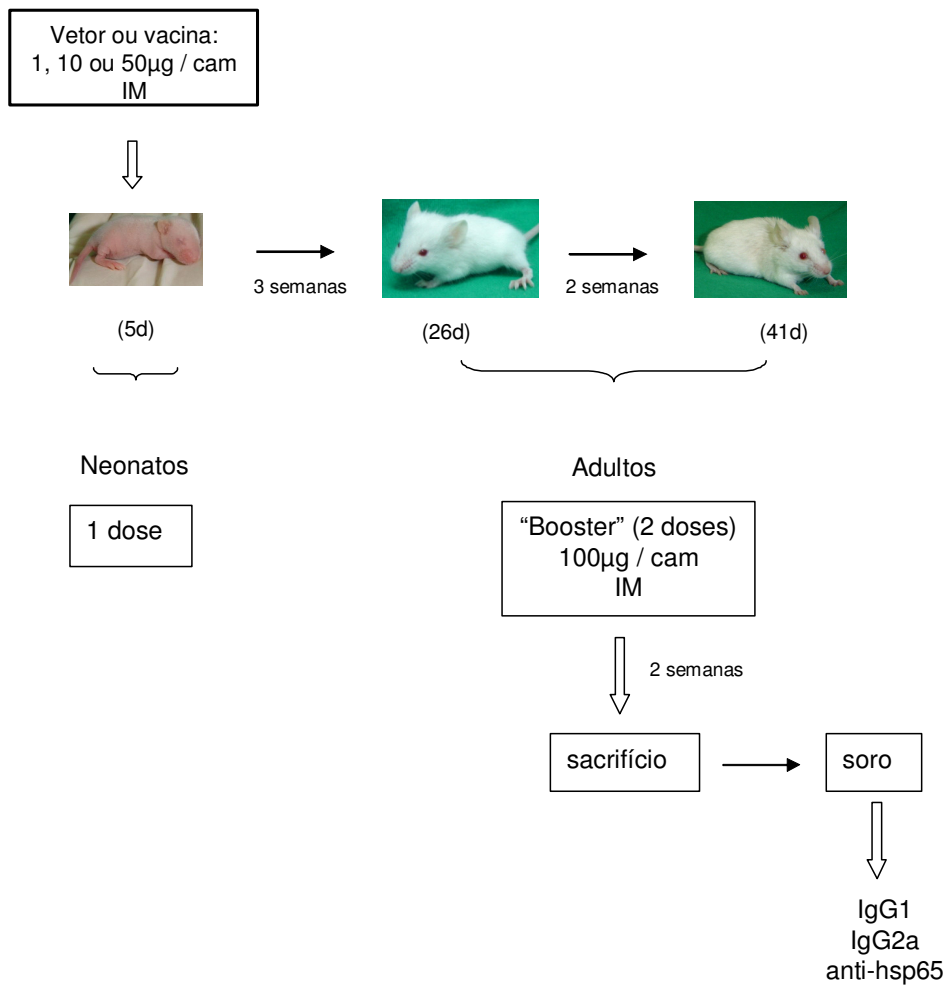


IV. PROTOCOLOS E RESULTADOS

Em virtude da multiplicidade de protocolos e com a intenção de facilitar o entendimento dos resultados, os mesmos serão sempre precedidos dos respectivos protocolos utilizados.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1

Objetivo: Avaliar se a administração de diferentes doses da vacina DNAhsp65 no período neonatal induz tolerância.



IV. PROTOCOLOS E RESULTADOS

Em virtude da multiplicidade de protocolos e com a intenção de facilitar o entendimento dos resultados, os mesmos serão sempre precedidos dos respectivos protocolos utilizados.

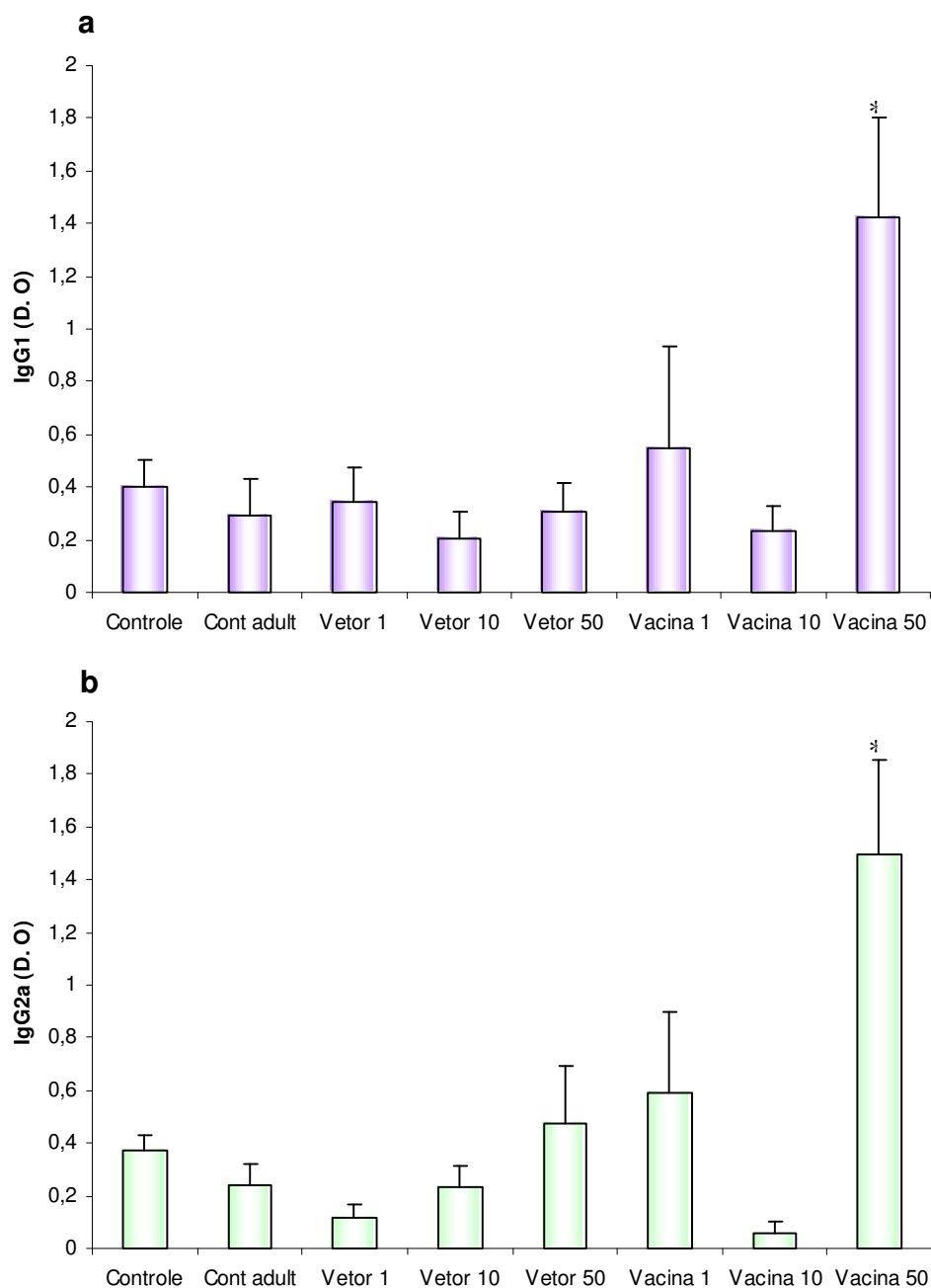
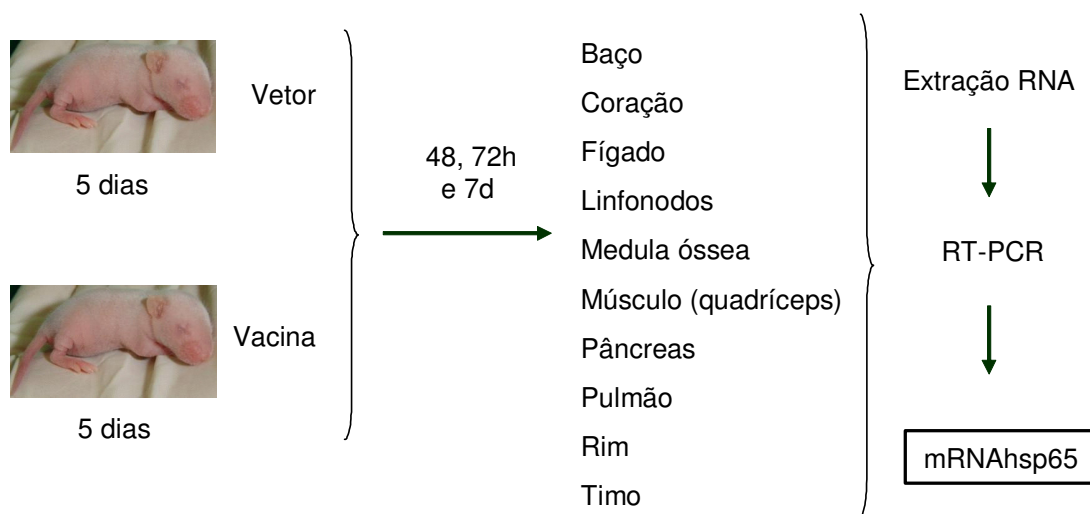


Figura 1: Concentração sérica de anticorpos IgG1 (a) e IgG2a (b) em camundongos BALB/c que receberam 1 dose da vacina gênica (DNAhsp65) no período neonatal (1, 10 ou 50µg, via IM) e 2 doses no período adulto (100µg / cam – via IM). Concentração de anticorpos em amostras de soro obtidas após 3 doses da vacina gênica. Média da D.O. ± EPM de 4-8 camundongos após diluição 1:25 das amostras. * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2

Objetivo: Avaliar a presença de mensagem para hsp65 nos diferentes tecidos de animais imunizados no período neonatal.



Resultados

Após a imunização dos camundongos neonatos (5 dias) com 50 μ g da vacina (n = 2; A1 e A2), foi detectada mensagem para hsp65 no músculo dos animais após 48h, 72h e 7 dias (tabela 1). Apenas em um animal não foi detectada mensagem para hsp65 no músculo após 7 dias.

No sétimo dia foi detectada mensagem para hsp65 no fígado de um dos animais. Nos três períodos avaliados não foi detectada mensagem em nenhum dos demais órgãos avaliados. O pâncreas não foi analisado porque o RNA obtido estava degradado. Esses resultados estão mostrados nas figuras 2, 3 e 4. Junto aos resultados estão mostradas as amplificações do cDNA da β -actina demonstrando a boa qualidade das amostras de RNA.

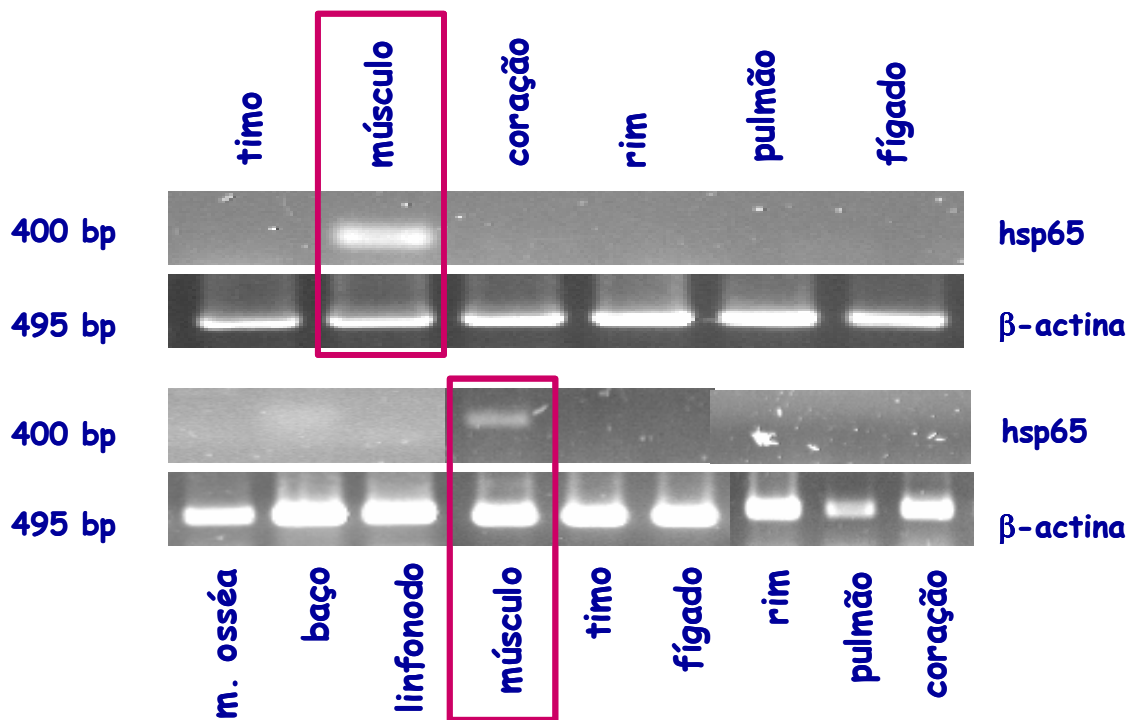


Figura 2: mRNA para hsp65 e β -actina em diferentes tecidos após 48h de imunização. A presença de mensagem foi detectada por RT-PCR utilizando-se primers específicos. A qualidade do RNA utilizado foi determinada pela amplificação da β -actina (400 bp). Os dados correspondem a 2 animais por grupo.

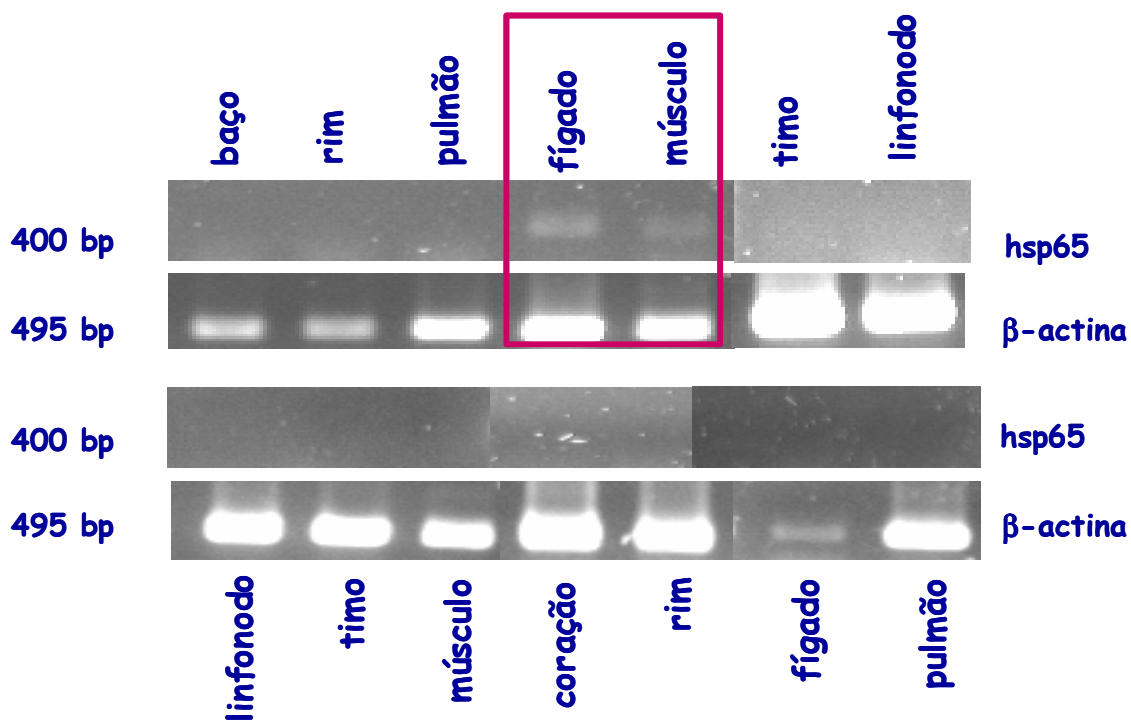


Figura 4: mRNA para hsp65 e β -actina em diferentes tecidos após 7 dias de imunização. A presença de mensagem foi detectada por RT-PCR utilizando-se primers específicos. A qualidade do RNA utilizado foi determinada pela amplificação da β -actina (400 bp). Os dados correspondem a 2 animais por grupo.

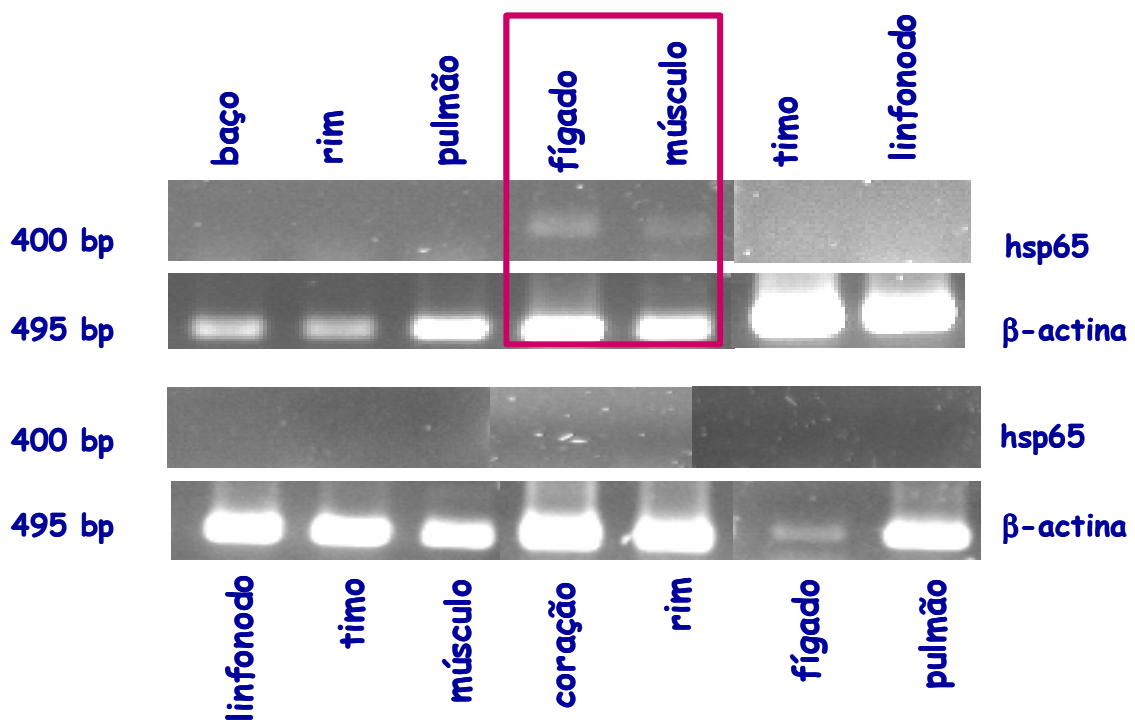


Figura 4: mRNA para hsp65 e β -actina em diferentes tecidos após 7 dias de imunização. A presença de mensagem foi detectada por RT-PCR utilizando-se primers específicos. A qualidade do RNA utilizado foi determinada pela amplificação da β -actina (400 bp). Os dados correspondem a 2 animais por grupo.

mRNA – hsp65

	48h		72h		7d	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2
Medula óssea (M. óssea)	#	-	#	#	#	#
Timo	-	-	#	-	-	-
Linfonodo	-	-	#	#	-	-
Baço	#	-	#	-	-	#
Músculo	+	+	+	+	+	-
Coração	-	-	-	-	#	-
Rim	-	-	-	-	-	-
Fígado	-	-	-	-	+	-
Pulmão	-	-	-	-	-	-
Pâncreas	#	#	#	#	#	#

- = Negativo

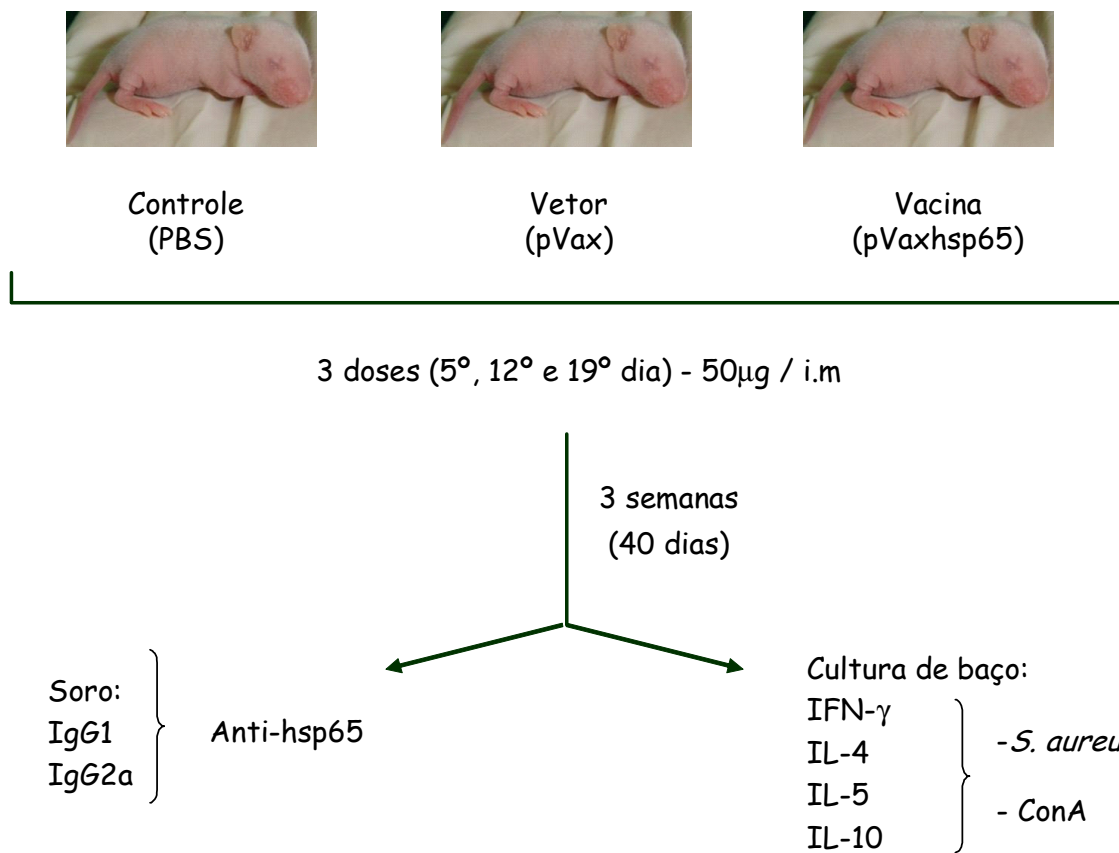
= RNA degradado

+ = Positivo

Quadro 1: Resumo das amostras processadas e testadas quanto à presença de mRNA para hsp65 nos diferentes tecidos. Todos os animais, com exceção de um animal com 7 dias, apresentaram RT+ para hsp65 no músculo. Somente um animal com 7 dias apresentou RT+ para hsp65 no fígado. Nos demais tecidos não foi encontrada mensagem para hsp65. Os dados correspondem a 2 animais por grupo.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL 3

Objetivo: Avaliar se a vacina DNAhsp65 é imunogênica quando administrada integralmente (3 doses) no período neonatal.



Resultados

Produção de IFN- γ

Os resultados referentes à produção de IFN- γ são mostrados na figura 5. Não ocorreu produção de IFN- γ nas culturas dos três grupos nas quais não adicionamos estímulos. Níveis significativos de IFN- γ foram produzidos em resposta aos estímulos *S. aureus* e ConA, sendo que o ativador policlonal, como esperado, induziu produção significativamente mais elevada do que o *S. aureus*. Não houve, entretanto, diferença significativa na produção desta citocina entre os grupos controle, vetor e vacina.

Produção de IL-4 e IL-5

As concentrações de IL-4 e IL-5 são mostradas na figura 6. Somente o estímulo com ConA induziu níveis detectáveis e significativos destas citocinas nos sobrenadantes. Os níveis de IL-4 foram significativamente mais elevados no grupo vacinado do que nos grupos controle e vetor. A produção de IL-5 seguiu o mesmo padrão da IL-4, entretanto as diferenças observadas não foram consideradas estatisticamente significativas.

Produção de IL-10

A figura 7 representa os resultados referentes à produção de IL-10. Nas culturas estimuladas por *S. aureus* a produção de IL-10 no grupo vacina foi

significativamente menor do que a observada nos grupos vetor e controle. A produção de IL-10 estimulada por ConA foi similar nos três grupos.

Produção de anticorpos anti-hsp65

Os níveis séricos de anticorpos anti-hsp65 são mostrados na figura 8: produção de IgG1 (a) e IgG2a (b). Com relação a produção de IgG1, não ocorreu diferença significativa entre os grupos experimentais, embora haja uma tendência para maior produção nos animais vacinados do que naqueles que receberam o vetor. No grupo de animais que recebeu vacina observou-se um aumento nos níveis de IgG2a quando comparado com o grupo vetor.

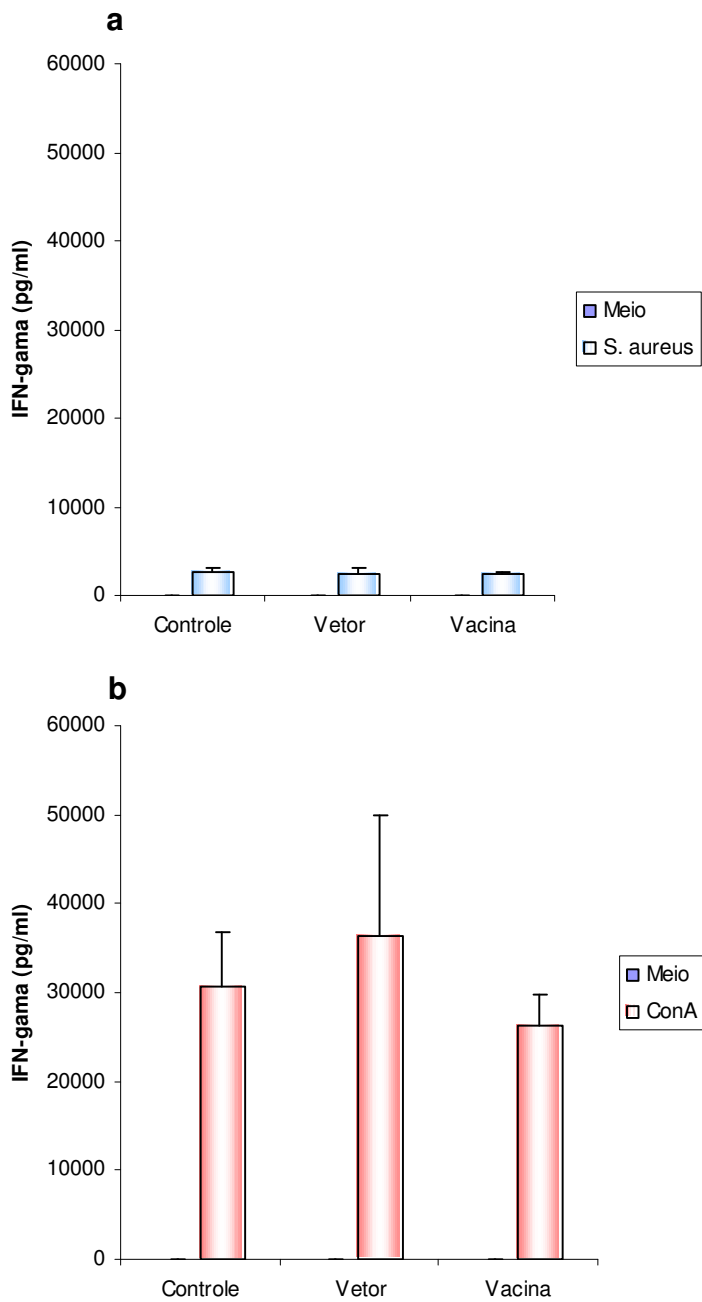


Figura 5: Produção de IFN- γ por células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados integralmente no período neonatal (3 doses de 50 μ g, via IM). Células esplênicas foram coletadas 15 dias após a última dose de DNA e as culturas estimuladas com *S. aureus* (a) ou ConA (b). Os sobrenadantes foram coletados após 48 horas e a concentração de IFN- γ avaliada por ELISA. Média \pm EPM de 4-8 animais.

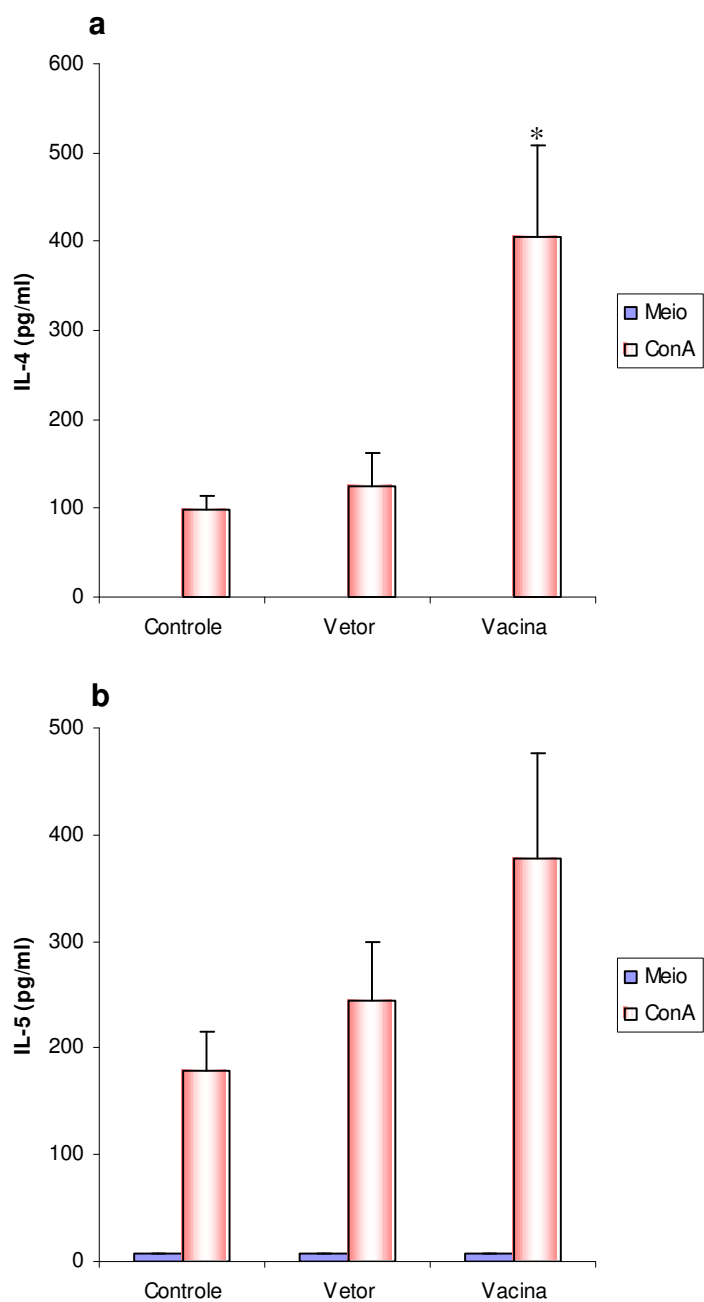


Figura 6: Produção de IL-4 (a) e IL-5 (b) por células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados integralmente no período neonatal (3 doses de 50µg, via IM). Células esplênicas foram coletadas 15 dias após a última dose de DNA e as culturas estimuladas com ConA. Os sobrenadantes foram coletados após 48 horas e a concentração de citocinas avaliada por ELISA. Média ± EPM de 4-8 animais. *p<0,05 em relação aos grupos controle e vetor.

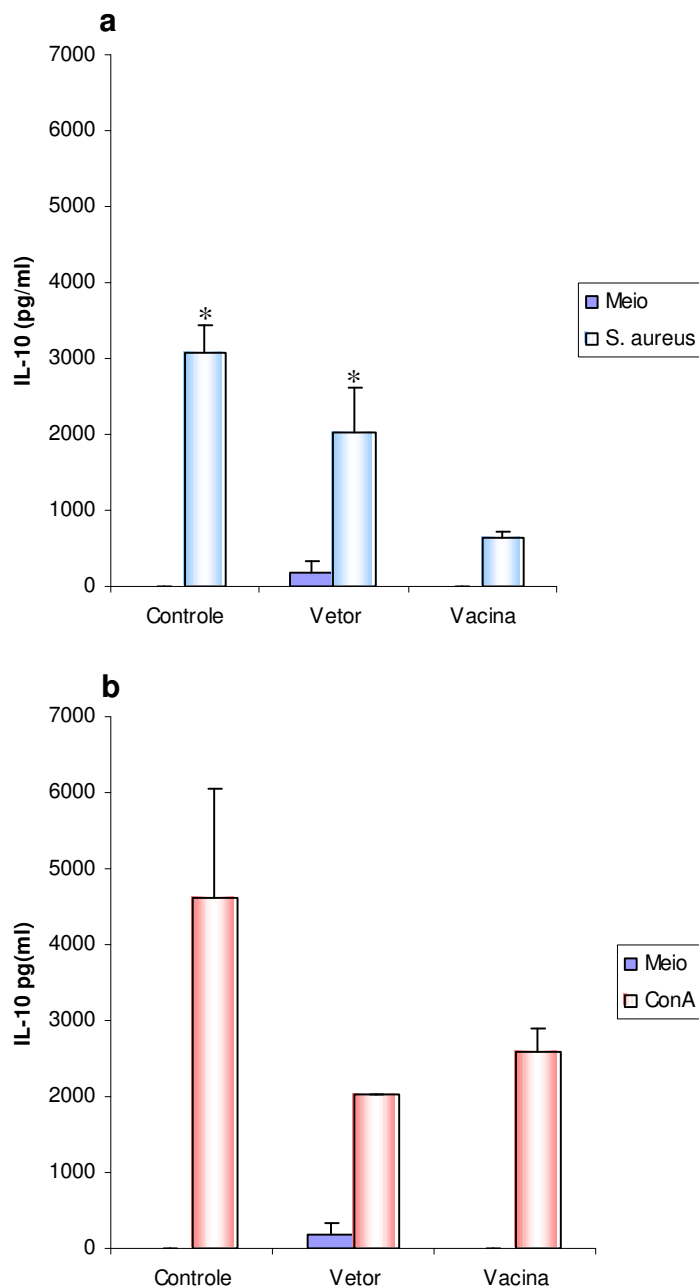


Figura 7: Produção de IL-10 por células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados integralmente no período neonatal (3 doses de 50µg, via IM). Células esplênicas foram coletadas 15 dias após a última dose de DNA e as culturas estimuladas com *S. aureus* (a) ou ConA (b). Os sobrenadantes foram coletados após 48 horas e a concentração de IL-10 avaliada por ELISA. Média ± EPM de 4-8 animais. *p<0,05 em relação ao grupo vacina.

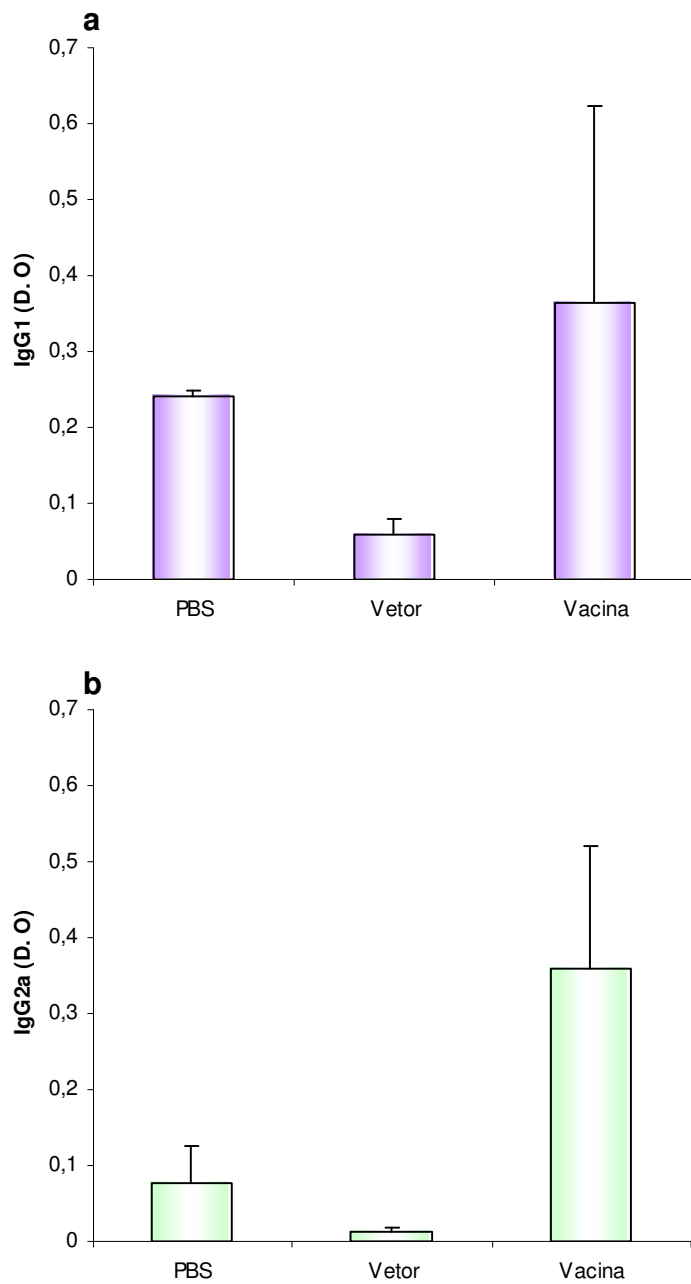
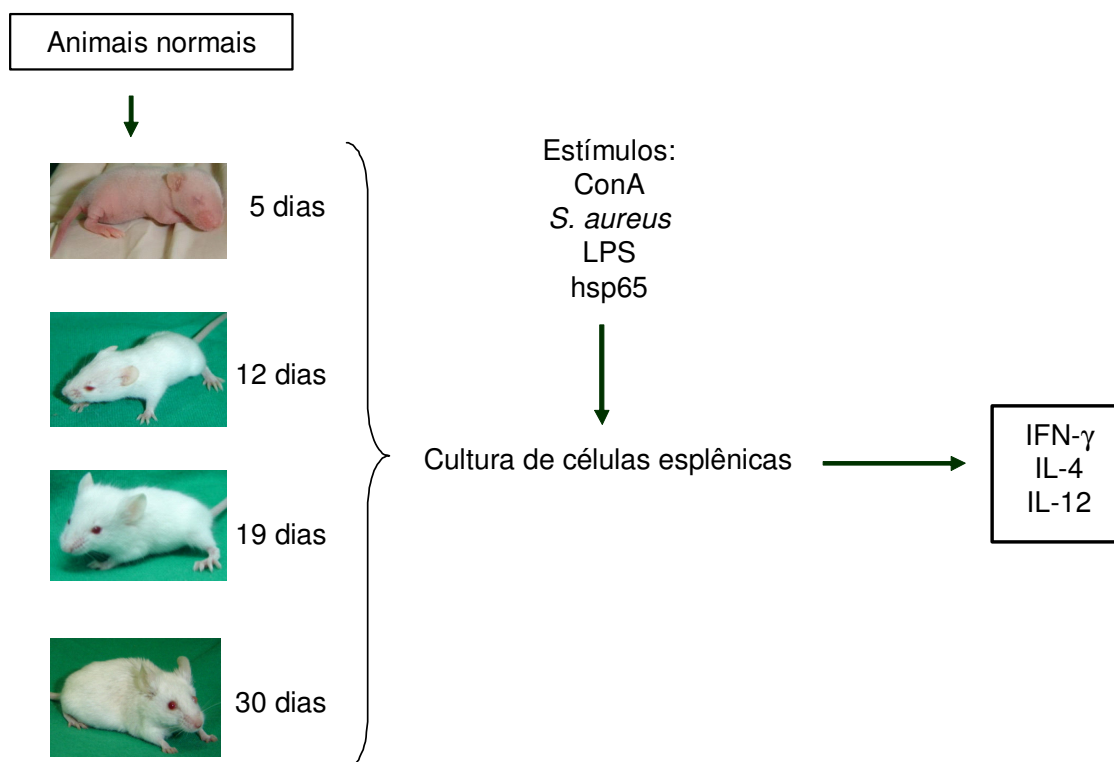


Figura 8: Concentração sérica de anticorpos IgG1 (a) e IgG2a (b) em camundongos BALB/c que receberam 3 doses da vacina gênica (DNAhsp65) no período neonatal (3 doses de 50 μ g, via IM). Média da D.O \pm EPM de 4-8 amostras testadas após diluição 1:25.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL 4

Objetivo: Avaliar se a baixa imunogenicidade da vacina DNAhsp65 no neonato se deve a produção diferencial de citocinas neste período em comparação com animais adultos.



Resultados

Os resultados apresentados nas figuras 9, 10 e 11, mostram produção diferencial das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-12 em camundongos jovens comparados com os animais adultos.

Quanto à produção de IFN- γ por células estimuladas com ConA, tanto camundongos jovens, incluindo os neonatos, quanto os adultos, produziram esta citocina, sem diferença estatística entre os grupos. Nas culturas estimuladas com LPS observamos produção significativamente maior de IFN- γ por células dos animais adultos. Quando as células foram estimuladas com *S. aureus*, esta diferença entre jovens e adultos foi ainda mais acentuada; neste caso só ocorreu produção de IFN- γ por células de animais adultos (figura 9). Um perfil bastante similar aos induzidos por LPS e *S. aureus* foi observado nas culturas estimuladas com rhsp65, ou seja, produção significativa de IFN- γ por células de adultos em comparação com os demais períodos.

O único estímulo que induziu níveis detectáveis de IL-4 foi a ConA. Estes resultados são apresentados na figura 11a e mostram produção significativamente maior de IL-4 por células de camundongos jovens (19 dias) em comparação com células dos demais grupos. No 12º dia foi observada produção maior de IL-4 mas não foi constatada diferença estatística. A produção desta citocina pelos neonatos foi similar à observada nos animais adultos.

A indução de IL-12 só foi observada nas culturas estimuladas com *S. aureus* e os resultados apresentados na figura 11b mostram claramente a

produção desta citocina pelas células dos animais adultos, mas não pelas células dos neonatos ou jovens.

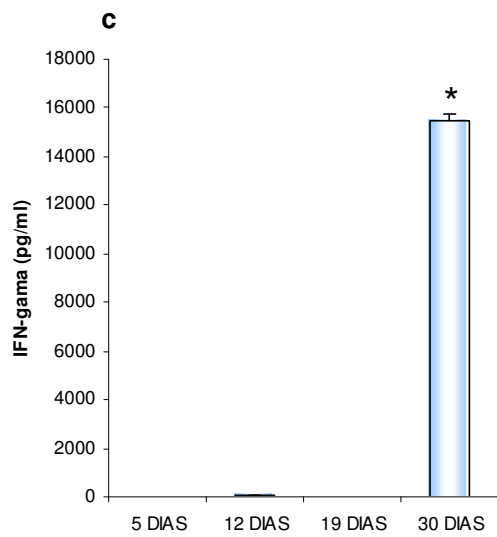
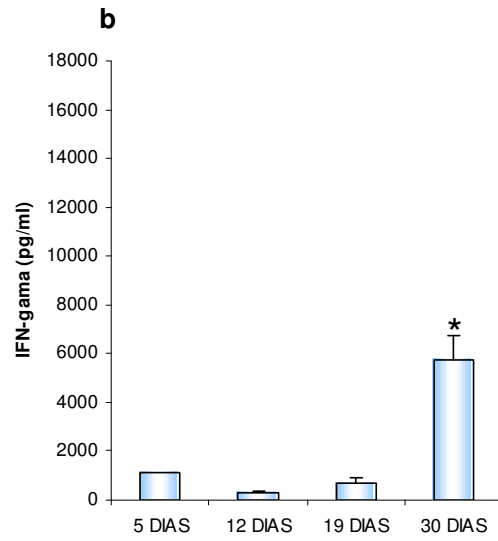
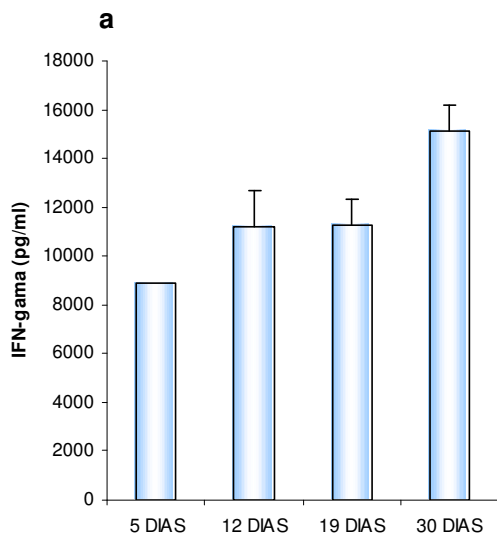


Figura 9: Produção de IFN- γ por células esplênicas de camundongos BALB/c normais (5, 12, 19 e 30 dias de idade) estimuladas com ConA (a) ($5\mu\text{g} / \text{ml}$ de cultura), LPS (b) ($5\mu\text{g} / \text{ml}$ de cultura e *S. aureus* (c) ($1/5000$). Média \pm EPM. OBS: Resultados do dia 5 referem-se a um pool de 5 animais. * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos.

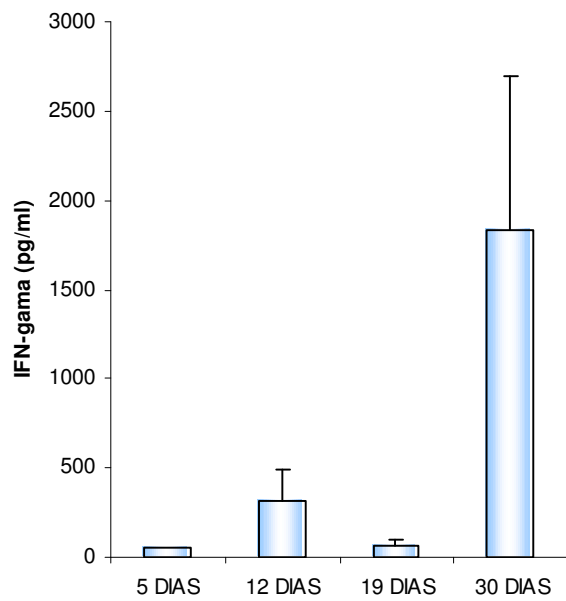


Figura 10: Produção de IFN- γ por células esplênicas de camundongos BALB/c normais (5, 12, 19 e 30 dias de idade) estimuladas com rhsp65 (10 μ g / ml de cultura). Média \pm EPM. OBS: resultados do dia 5 referem-se a um pool de 5 animais.

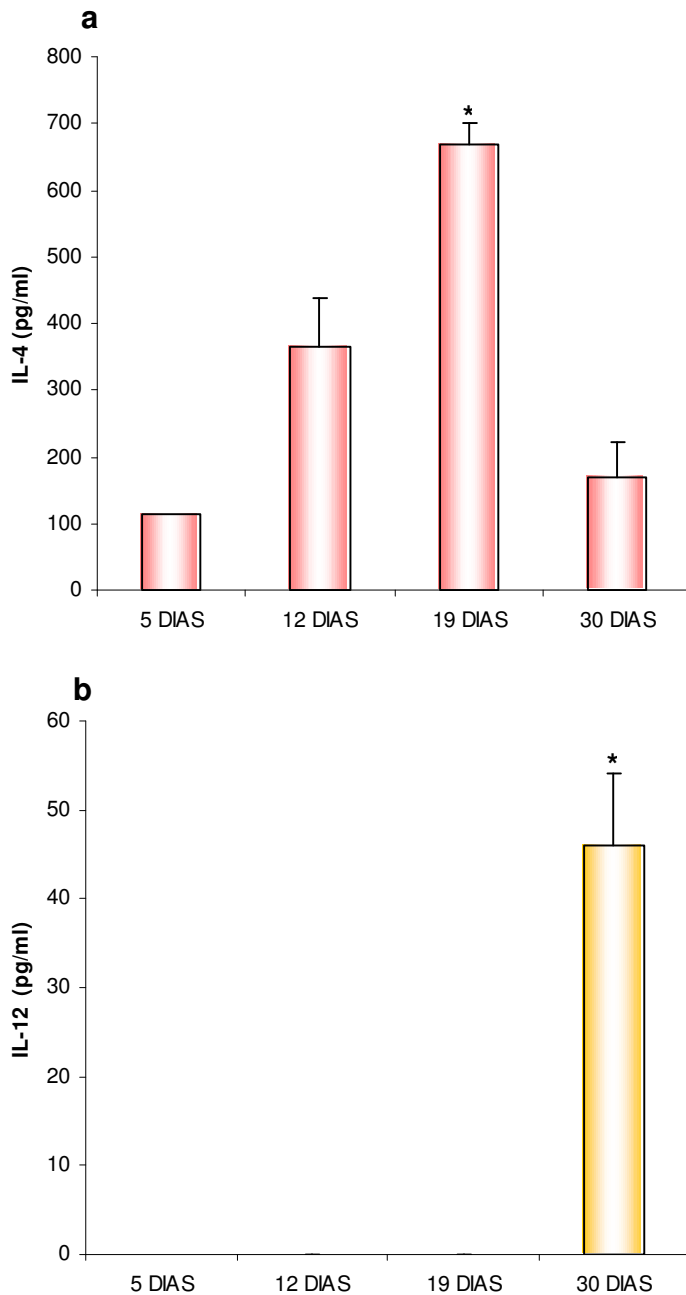
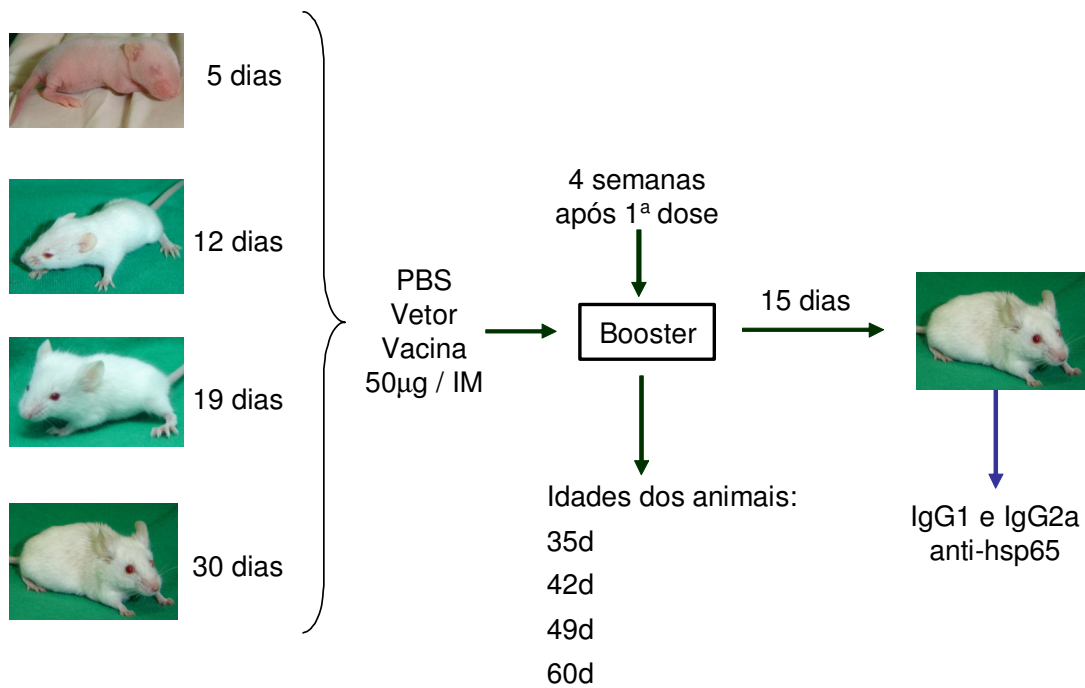


Figura 11: Produção de IL-4 (a) e IL-12 (b) por células esplênicas de camundongos BALB/c normais (5, 12, 19 e 30 dias de idade) estimuladas com ConA (5 μ g / ml de cultura) e *S. aureus* (1 / 5000) respectivamente. Média \pm EPM. OBS: resultados do dia 5 referem-se a um pool de 5 animais. * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL 5

Objetivo: Avaliar se esta baixa imunogenicidade está associada com indução de tolerância em alguns dos diferentes períodos de imunização.



Resultados

O perfil de produção de IgG1 e IgG2a foi distinto: os níveis de IgG1 estavam igualmente elevados em todos os grupos enquanto que a produção de IgG2a foi mais elevada nos grupos cujo “priming” ocorreu em períodos mais precoces, isto é, aos 5 e 12 dias de idade.

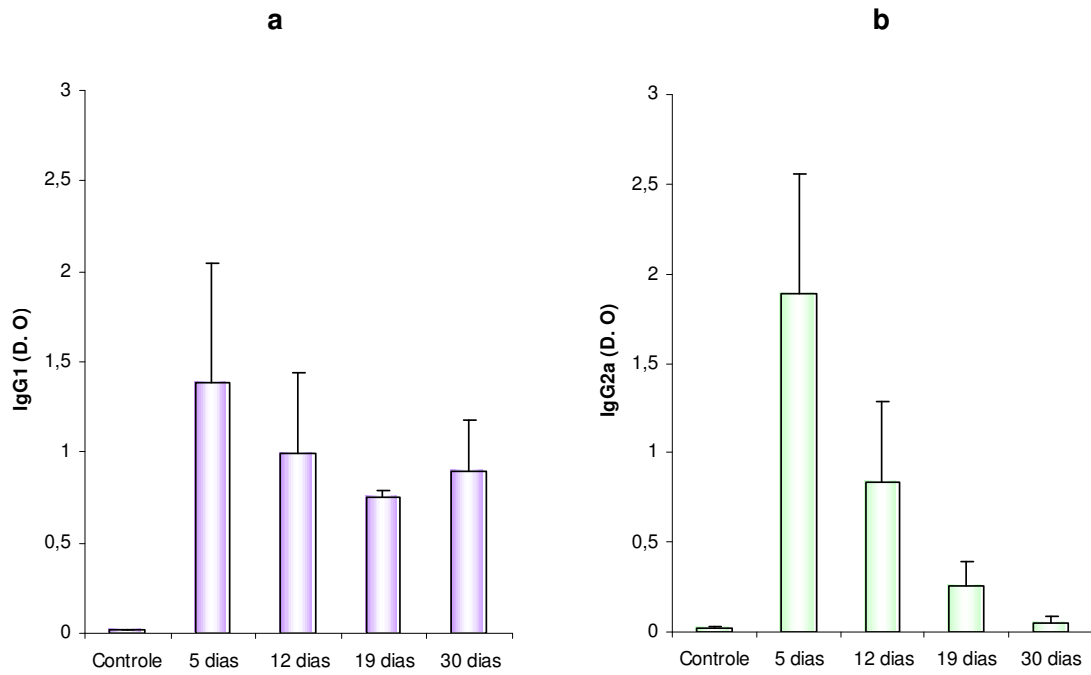
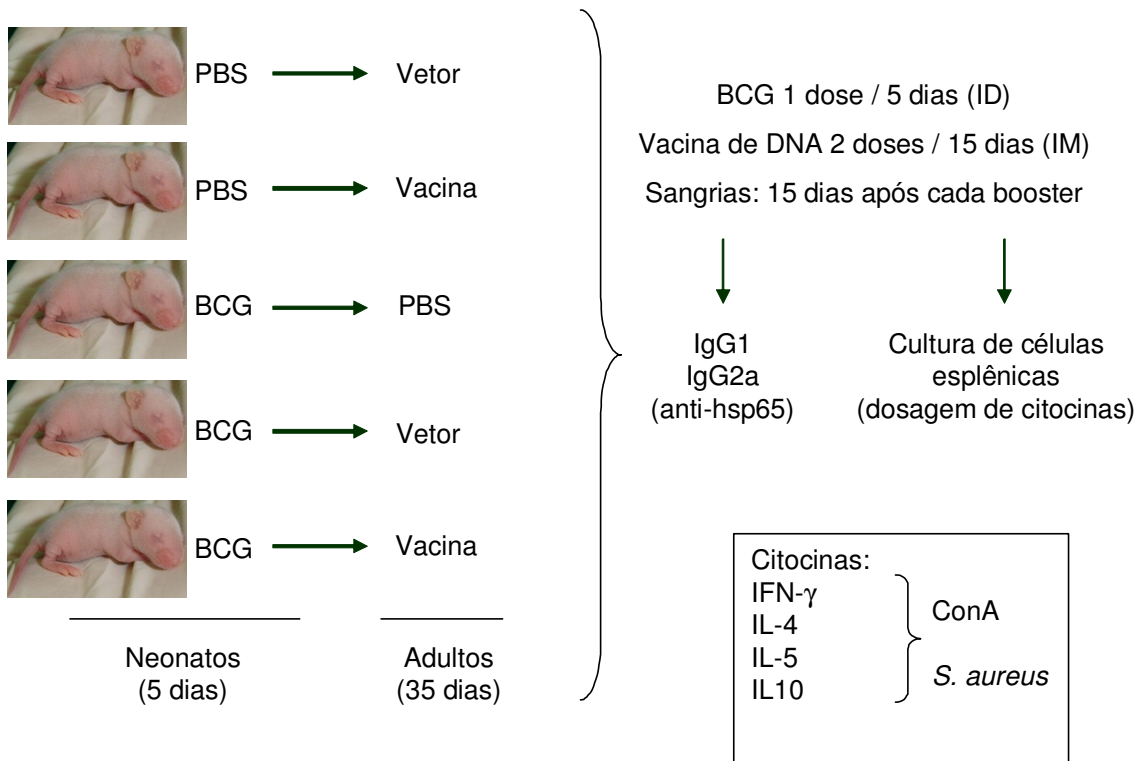


Figura 12: Concentração sérica de anticorpos IgG1 (a) e IgG2a (b) em camundongos BALB/c que receberam 1 dose da vacina gênica (DNAhsp65) no período neonatal (3 doses de 50µg, via IM) e 1 booster no período adulto (100µg / cam – via IM). Concentração de anticorpos em amostras de soro obtidas 15 dias após a última dose da vacina gênica. Média da D.O. ± EPM de 4-8 amostras testadas após diluição 1:25.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL 6

Objetivo: Avaliar a imunogenicidade da estratégia: BCG na fase neonatal seguida de DNAhsp65 na fase adulta



Resultados

Produção de citocinas

Como esperado não ocorreu produção, em níveis significativos, de nenhuma destas citocinas nas culturas controle (não estimuladas). A estimulação com PPD (antígeno específico da vacina BCG, administrada no período neonatal) também não induziu produção de nenhuma das citocinas testadas (resultados não mostrados). O estímulo com o antígeno da vacina gênica (hsp65), apesar de necessário, não foi realizado, pois esta preparação estava contaminada com altas concentrações de LPS, oriundo da *E. coli* transformada, utilizada para a obtenção da hsp65 recombinante. Para facilitar o entendimento dos resultados obtidos os mesmos são mostrados na seqüência: comparação dos grupos PBS/vetor e PBS/vacina e comparação dos três grupos imunizados com BCG no período neonatal. Apesar da semelhança entre os resultados referentes às citocinas tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10), optou-se por descrevê-las separadamente.

Produção de IFN- γ

Os resultados referentes à produção de IFN- γ induzidos por ConA e *S. aureus* são mostrados nas figuras 13a e b. Na parte a da figura 13 pode se observar que os animais vacinados com DNAhsp65 produziram níveis de IFN- γ em resposta à ConA significativamente mais elevados do que os animais injetados só com o vetor (grupo controle). Todos os grupos vacinados com BCG (parte b da figura) no período neonatal produziram níveis significativos e similares desta citocina em

resposta à ConA. O *S. aureus* induziu níveis significativos de IFN- γ nos cinco grupos experimentais, mas estes níveis foram semelhantes entre os grupos.

Produção de IL-4

As concentrações de IL-4 nos sobrenadantes das células esplênicas são mostrados na figura 14. Somente o estímulo com ConA induziu níveis detectáveis e significativos de IL-4. Foi observada diferença significativa nos níveis desta citocina entre os grupos PBS/vetor e PBS/vacina.

As concentrações de IL-4 induzidas por ConA nos animais que receberam BCG foram similares (figura 14b). A comparação das concentrações de IL-4 em todos os grupos mostrou dois resultados bastante interessantes: a produção significativamente maior de IL-4 no grupo PBS/vetor, ou seja, no grupo não imunizado (figura 14a), e a produção significativamente menor de IL-4 no grupo BCG/vacina quando comparada com o grupo PBS/vacina.

Produção de IL-5

As concentrações referentes à produção de IL-5 estão documentadas na figura 15. No grupo PBS/vacina os níveis de IL-5 foram significativamente menores que no grupo PBS/vetor (figura 15a). A comparação dos grupos vacinados no período neonatal com BCG mostra que os grupos posteriormente injetados com vetor ou vacina produziram níveis significativamente mais elevados de IL-5 que o grupo BCG/PBS (figura 15b).

A indução de IL-5 por *S. aureus* ocorreu nos grupos que receberam BCG no período neonatal (figura 15b). Esses valores foram, entretanto, baixos e variáveis. A produção de IL-5 estimulada por ConA foi significativamente mais elevada no grupo BCG/vacina do que no grupo PBS/vacina.

Produção de IL-10

Na figura 16 podem ser observados os resultados da produção de IL-10. Tanto *S. aureus* quanto ConA induziram produção significativa desta citocina em todos os grupos experimentais. No grupo PBS/vetor, a produção de IL-10, tanto estimulada por *S. aureus* quanto por ConA foi mais elevada que no grupo PBS/vacina (figura 16a). Esta diferença foi estatisticamente significativa. A produção de IL-10 induzida por *S. aureus* foi similar nos três grupos vacinados com BCG no período neonatal (figura 16b). Quando estes grupos foram estimulados por ConA, o grupo BCG/PBS produziu níveis significativamente mais elevados desta citocina do que os grupos BCG/vetor e BCG/vacina. Nos 5 grupos experimentais foi observada produção significativa de IL-10 após estímulo com *S. aureus* (figura 16). A comparação dos grupos PBS/vacina e BCG/vacina não mostrou diferença significativa. A estimulação com ConA também induziu produção significativa desta citocina em todos os grupos (figura 16). Não foi detectada, entretanto, diferença entre os grupos PBS/vacina e BCG/vacina.

Produção de Anticorpos anti-hsp65

Os níveis séricos de anticorpos anti-hsp65 são demonstrados nas figuras 17 e 18, as quais referem-se à produção de IgG1 e IgG2a, respectivamente. Nas figuras 17a e 18a são mostrados os valores obtidos após a imunização com BCG. Essas amostras foram coletadas antes da inoculação do DNA, ou seja, 4 semanas após a imunização com BCG. Nas figuras 17b e 18b são mostrados os valores encontrados 15 dias após a segunda dose da vacina gênica. Nas amostras obtidas na 4^a semana após a imunização com BCG ou inoculação de PBS não se observou produção de anti-hsp65. Animais do grupo PBS/vacina produziram níveis significativos de IgG1 quando comparados com o grupo PBS/vetor. No grupo BCG/vacina a concentração de IgG1 anti-hsp65 foi significativamente mais elevada do que a encontrada no grupo PBS/vacina. O perfil de produção de IgG2a foi semelhante ao da IgG1, tendo mostrado as mesmas diferenças significativas.

Os resultados referentes às amostras obtidas 15 dias após a 1^a dose foram muito discretos e por isto não são mostrados.

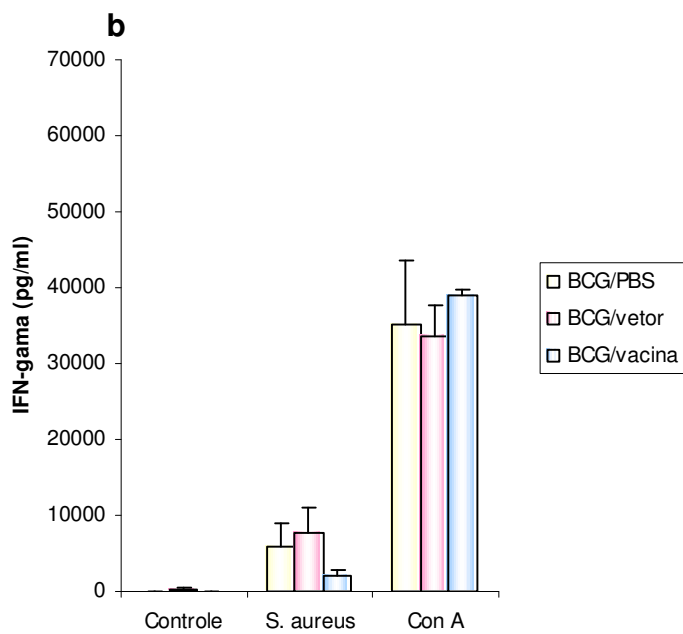
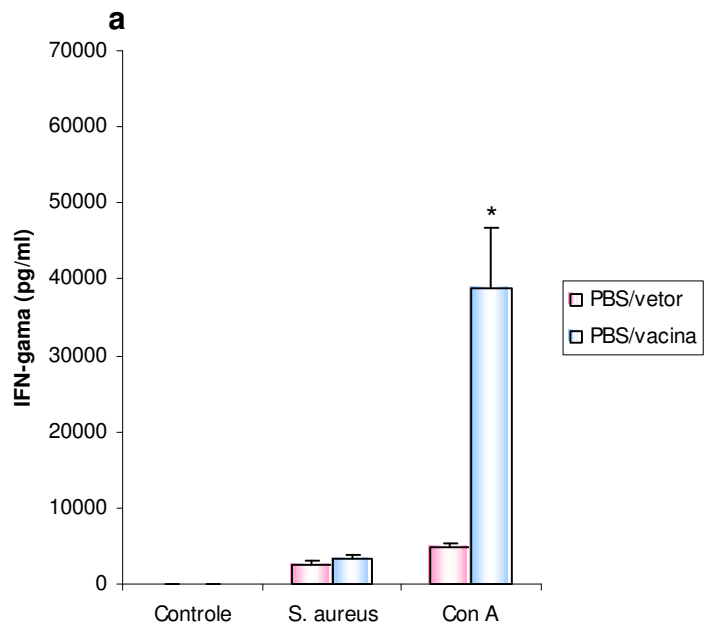


Figura 13: Produção de IFN- γ por células esplênicas de camundongos BALB/c primados com BCG no período neonatal e imunizados com vacina gênica (DNAhsp65) no período adulto. a) comparação entre os grupos PBS / vetor e PBS / vacina; b) comparação entre os três grupos primados com BCG. Média de 5 – 8 animais \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo PBS / vetor.

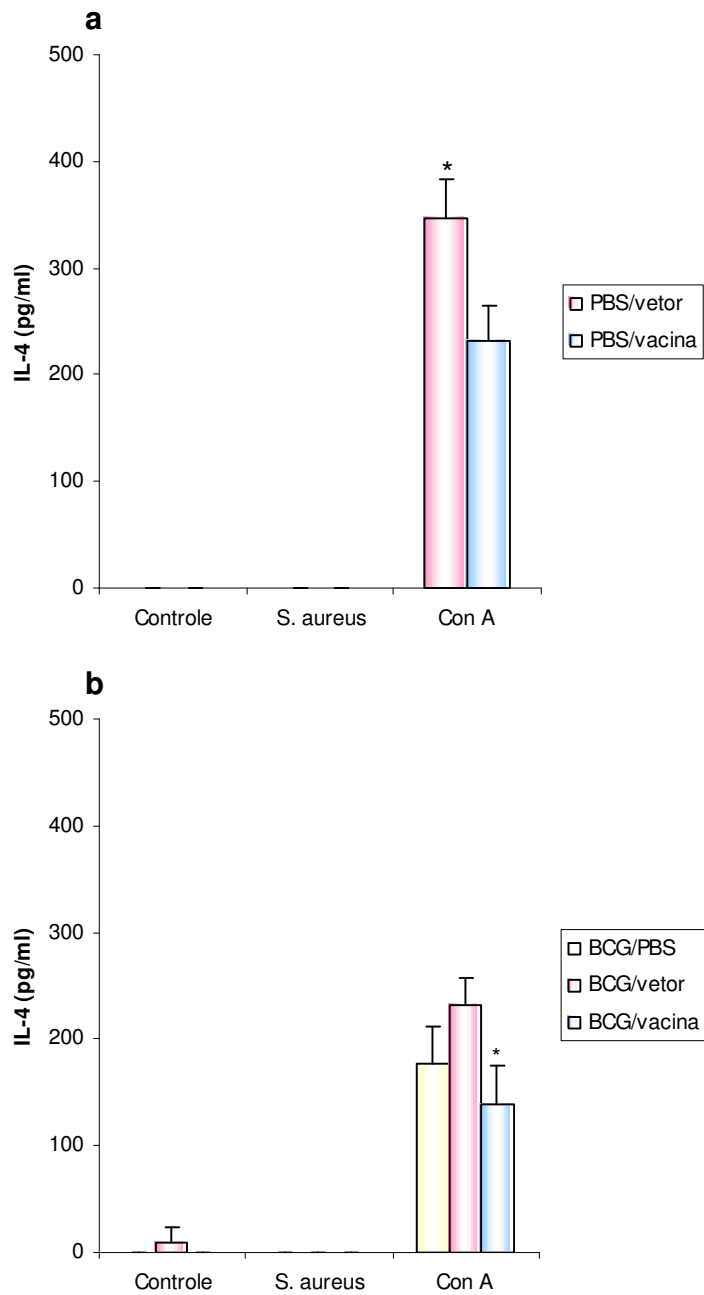


Figura 14: Produção de IL-4 por células esplênicas de camundongos BALB/c primados com BCG no período neonatal e imunizados com vacina gênica (DNAhsp65) no período adulto. a) comparação entre os grupos PBS / vetor e PBS / vacina; b) comparação entre os três grupos primados com BCG. Média de 5 – 8 animais \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo PBS / vacina.

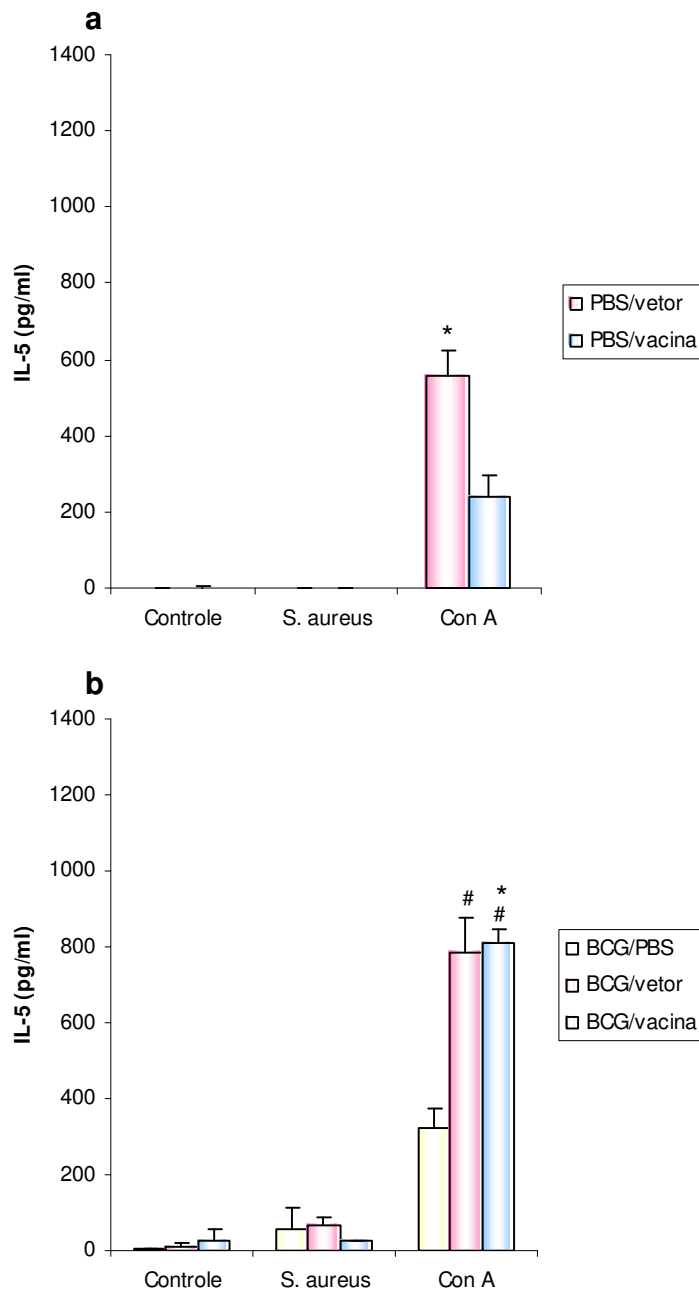


Figura 15: Produção de IL-5 por células esplênicas de camundongos BALB/c primados com BCG no período neonatal e imunizados com vacina gênica (DNAhsp65) no período adulto. a) comparação entre os grupos PBS / vetor e PBS / vacina; b) comparação entre os três grupos primados com BCG. Média de 5 – 8 animais \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo PBS / vacina # $p < 0,05$ em relação ao grupo BCG / PBS.

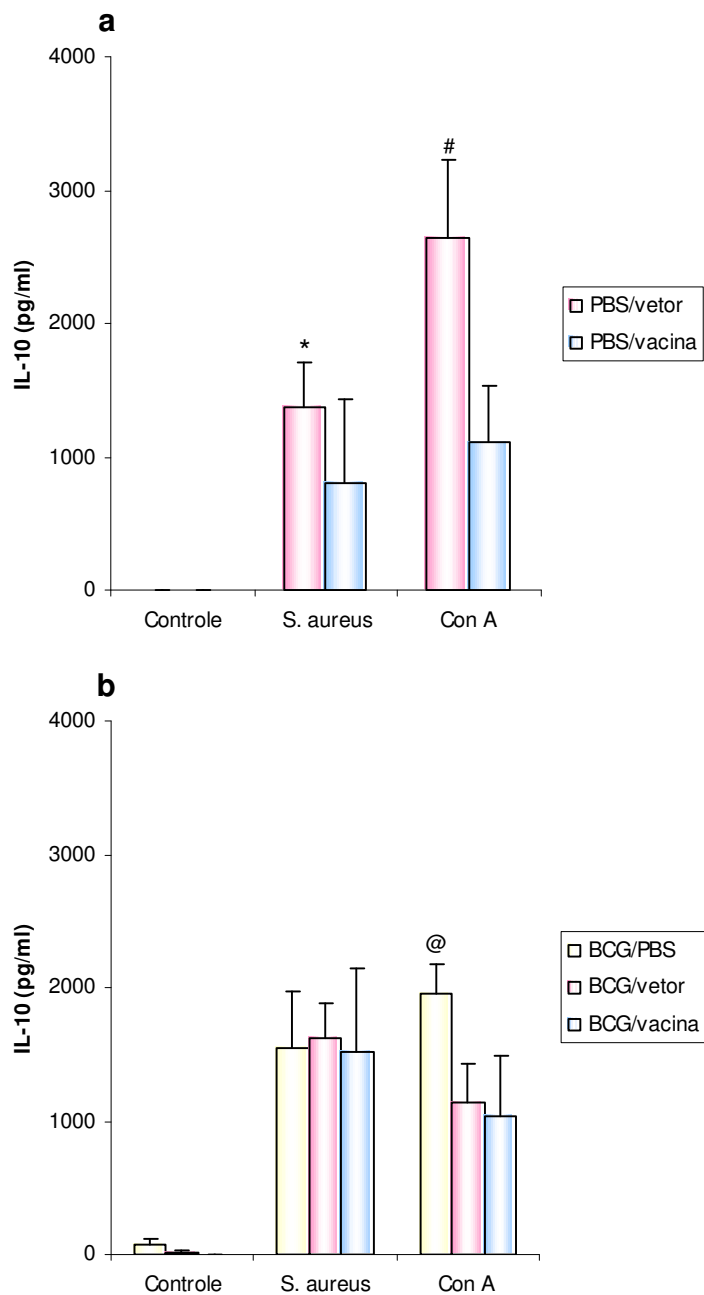


Figura 16: Produção de IL-10 por células esplênicas de camundongos BALB/c primados com BCG no período neonatal e imunizados com vacina gênica (DNAhsp65) no período adulto. a) comparação entre os grupos PBS / vetor e PBS / vacina; b) comparação entre os três grupos primados com BCG. Média de 5 – 8 animais \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo PBS / vacina. # $p < 0,05$ em relação ao grupo PBS / vacina. @ $p < 0,05$ em relação ao grupo BCG / vetor e BCG / vacina.

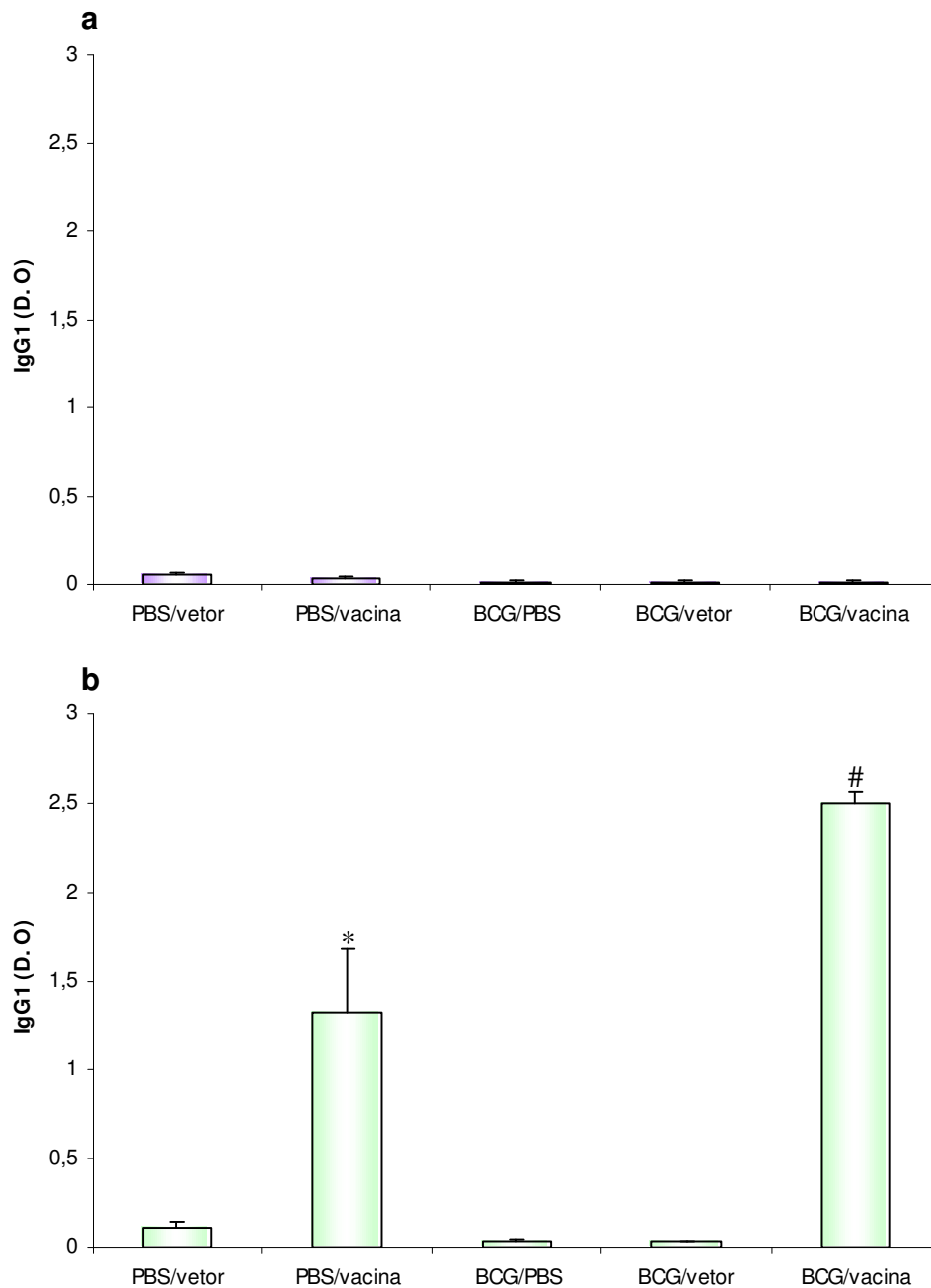


Figura 17: Concentração sérica de anticorpos IgG1 anti-hsp65 em camundongos BALB/c primados com BCG no período neonatal e imunizados com vacina gênica (DNAhsp65) no período adulto. (a) amostras obtidas antes da imunização com DNAhsp65; (b) amostras obtidas depois da imunização com DNAhsp65. Média da D.O \pm EPM de 5-7 amostras testadas após diluição 1:25. * $p < 0,05$ em relação ao grupo PBS/vetor. # $p < 0,05$ em relação ao grupo PBS/vacina.

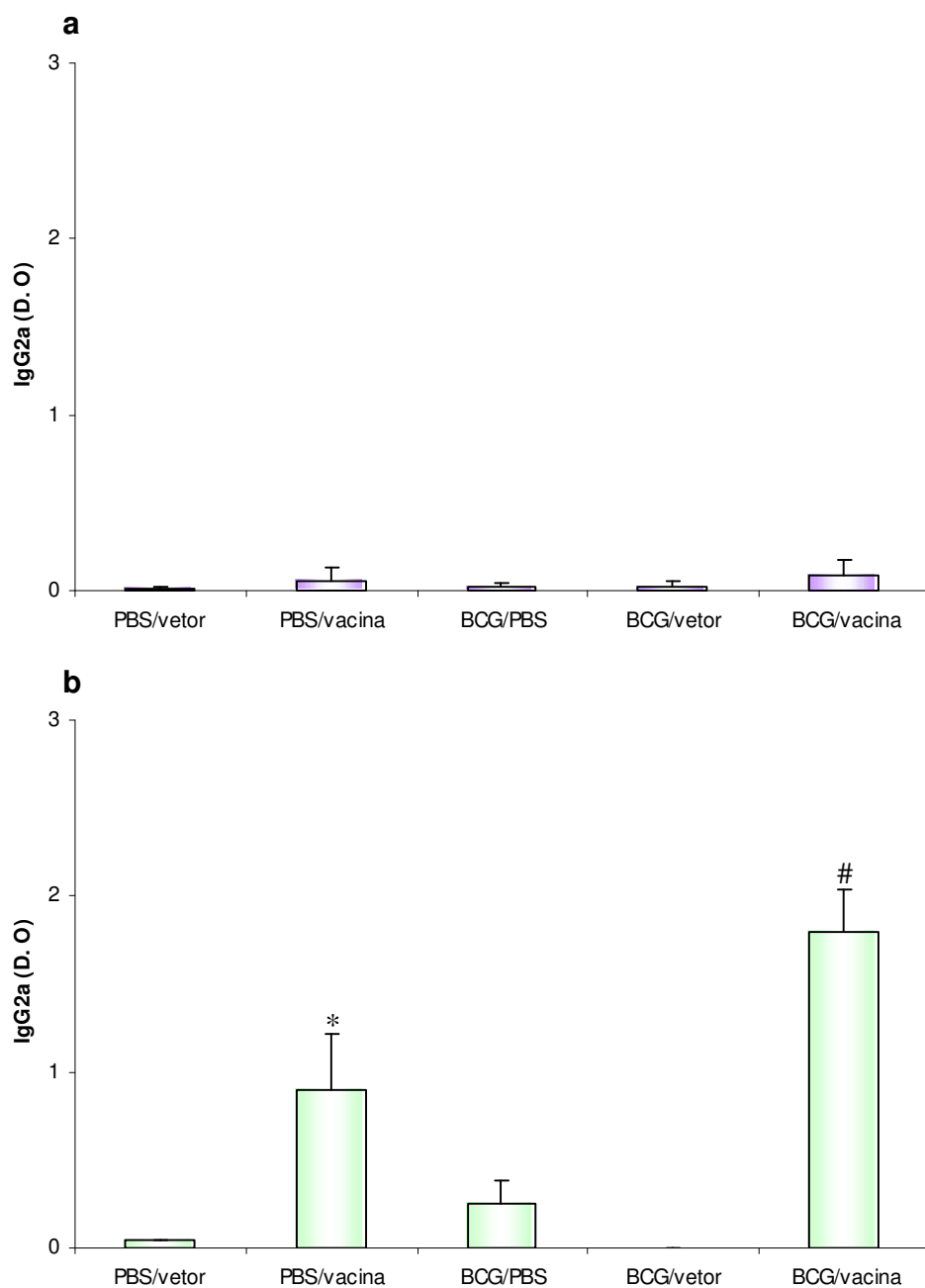


Figura 18: Concentração sérica de anticorpos IgG2a anti-hsp65 em camundongos BALB/c primados com BCG no período neonatal e imunizados com vacina gênica (DNAhsp65) no período adulto. (a) amostras obtidas antes da imunização com DNAhsp65; (b) amostras obtidas depois da imunização com DNAhsp65. Média da D.O \pm EPM de 5-7 amostras testadas após diluição 1:25. * $p < 0,05$ em relação ao grupo PBS/vetor. # $p < 0,05$ em relação ao grupo PBS/vacina.

Comparação da resposta imune humoral nos diferentes protocolos experimentais

Na figura 19 comparamos a produção de anticorpos anti-hsp65, induzida por três esquemas vacinais distintos: 3 doses de vacina gênica no período neonatal, 1 dose de vacina gênica no período neonato seguida de 2 doses no adulto e um priming com BCG no período neonatal seguido de dois boosters com vacina gênica no período adulto. Os resultados referentes a 2 doses de vacina gênica no adulto, como grupo controle, também são mostrados.

Como esperado e desejado, o vetor não foi capaz de induzir produção de anticorpos IgG1 ou IgG2a anti-hsp65. Por outro lado, nos animais vacinados ocorreu produção variável de anticorpos, a qual dependeu do esquema de vacinação. De forma genérica podemos dizer que o esquema de 3 doses no neonato foi menos eficaz e que o priming com DNA ou BCG no neonato seguido de DNA no adulto foram os mais eficientes. O esquema de 2 doses no adulto desencadeou produção de anticorpos mais discreta do que os protocolos de priming dos neonatos com BCG ou DNA.

Na figura 20 podemos observar, pela comparação dos valores médios observados em cada grupo que os animais vacinados com a estratégia prime-boost (BCG - DNA) produziram níveis semelhantes tanto de IgG1 quanto de IgG2a anti-hsp65 em comparação com os outros dois grupos experimentais.

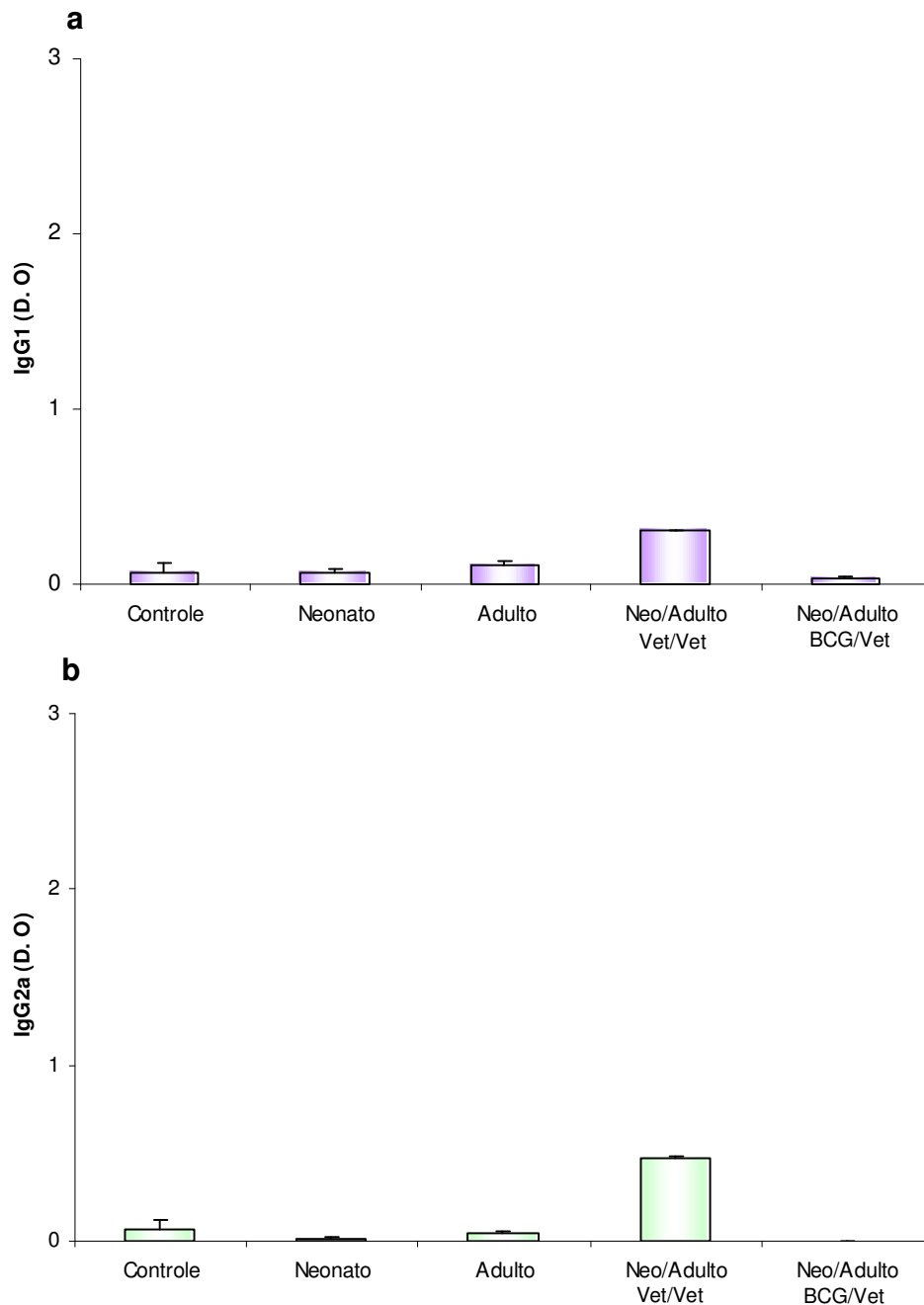


Figura 19: Concentração sérica de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-hsp65 em camundongos BALB/c injetados com vetor: 3 doses de vetor (pVax) no período neonatal (neonato); 2 doses de vetor no período adulto (adulto); priming com vetor e duas doses de vetor no período adulto (neo/adulto – Vet/Vet); priming com BCG e duas doses de vetor no período adulto (neo/adulto – BCG/Vet). Concentração de anticorpos em amostras de soro obtidas após a última inoculação de vetor. Média da D.O \pm EPM de 6-8 amostras testadas após diluição 1: 25.

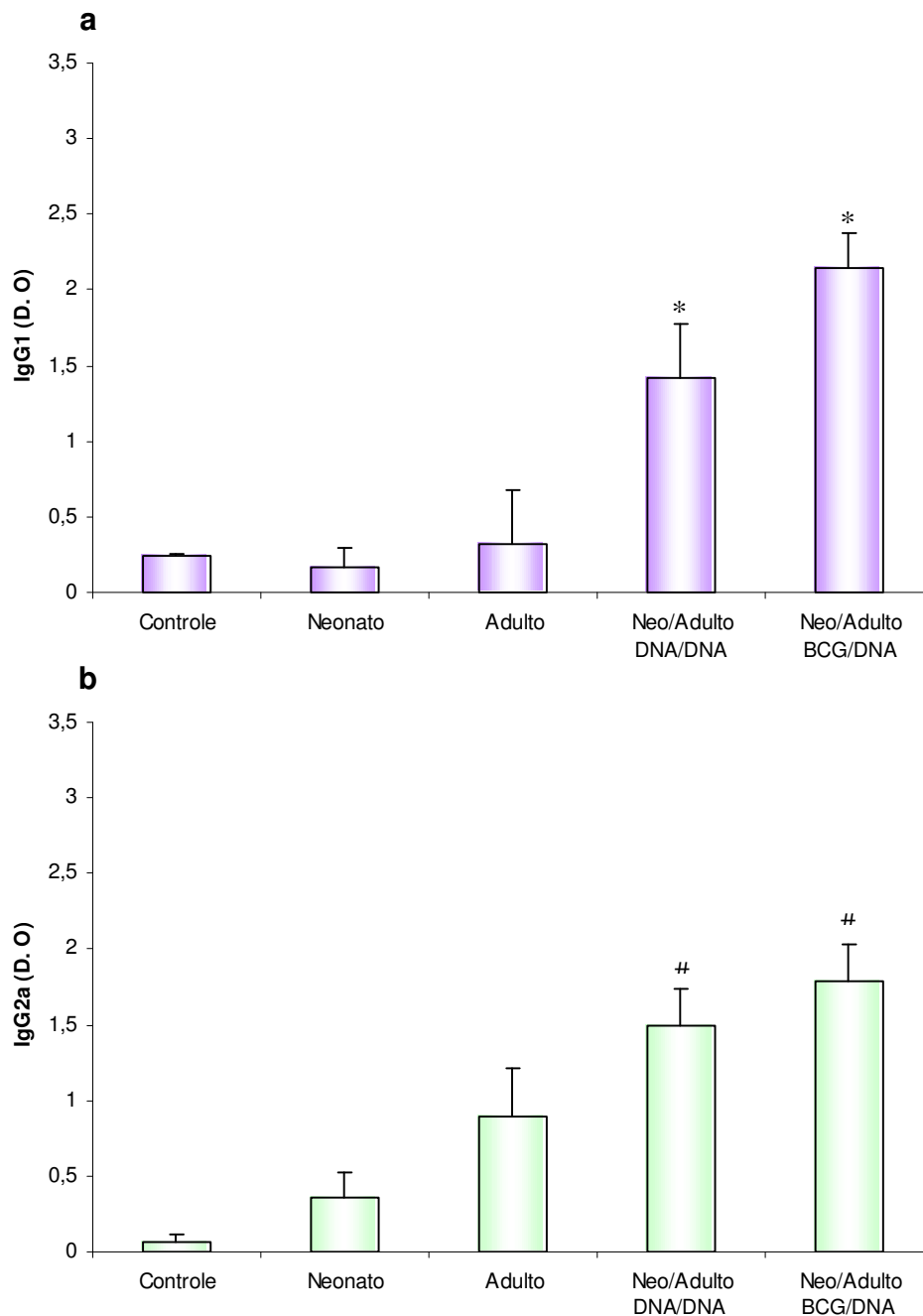
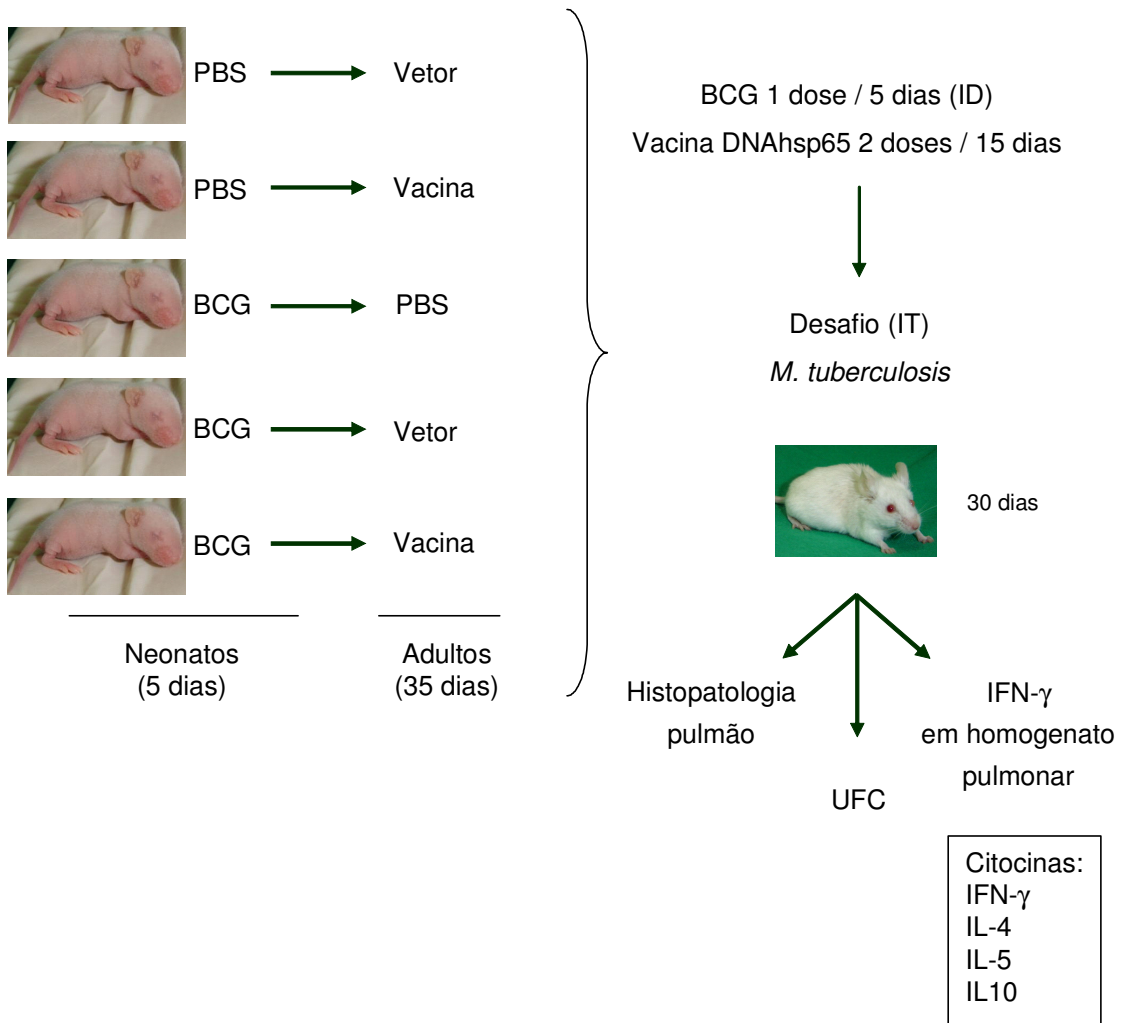


Figura 20: Concentração sérica de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-hsp65 em camundongos BALB/c que receberam diferentes esquemas de imunização: 3 doses da vacina gênica (DNAhsp65) no período neonatal (neonato); 2 doses de vacina no período adulto (adulto); priming com DNA e duas doses de DNA no período adulto (neo/adulto – DNA/DNA); priming com BCG e duas doses da vacina no período adulto (neo/adulto – BCG/DNA). Concentração de anticorpos em amostras de soro obtidas após a última imunização com a vacina gênica. Média da D.O \pm EPM de 6-8 amostras testadas após diluição 1:25. * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos. # $p < 0,05$ em relação aos grupos controle e neonato.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL 7

Objetivo: Avaliar a eficácia protetora da estratégia BCG no neonato seguida de DNAhsp65 no adulto



Resultados

Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

O número de UFC foi menor no grupo previamente imunizado só com BCG. Esse valor foi estatisticamente significativo com relação aos grupos controle infectado e vacina (figura 21).

Análise histopatológica do pulmão

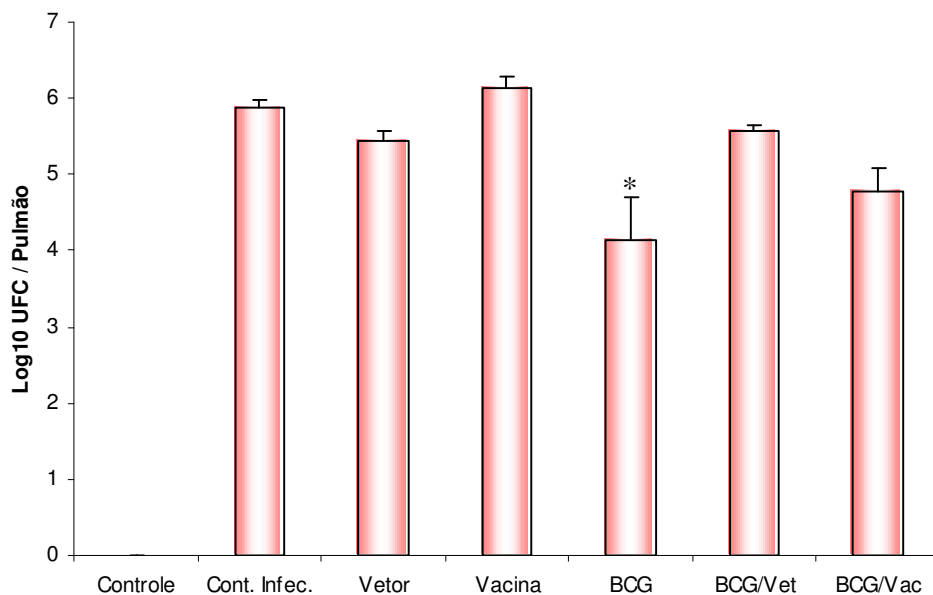
A análise histopatológica dos vários grupos experimentais encontra-se descrita no quadro abaixo:

Grupos Experimentais	Características do tecido pulmonar
Controle	Estrutura do parênquima está normal, os alvéolos estão bem definidos e não foram observadas células inflamatórias (figura 22).
Controle Infectado	Desorganização intensa da arquitetura do parênquima pulmonar. Presença de processo inflamatório acentuado com predomínio de células mononucleares. O processo inflamatório é disseminado por todo o parênquima, mas são observados grupamentos, ainda não totalmente definidos, constituídos de células mononucleares, principalmente em regiões perivasculares (figura 22).
Vetor	Parênquima comprometido com processo inflamatório

	<p>intenso, porém, mais discreto do que o apresentado no controle infectado. Algumas áreas de parênquima preservado podem ser observadas (figura 23).</p>
Vacina	<p>Muito semelhante ao do controle infectado. Desorganização evidente do parênquima com presença de inflamação difusa por todo o tecido. Células inflamatórias com predomínio de macrófagos. Neste caso as aglomerações celulares semelhantes a granulomas parecem estar mais desorganizadas e menores do que no grupo controle infectado (figura 22).</p>
BCG	<p>Parênquima íntegro e sem processo inflamatório. O aspecto do tecido é bastante similar ao do controle não infectado (figura 22).</p>
BCG / Vetor	<p>Presença de processo inflamatório intenso e formações semelhantes a granulomas (figura 23).</p>
BCG / Vacina	<p>Tecido bastante comprometido, com muita inflamação e presença de formações granulomatosas. Os granulomas parecem estar em maior número comparando-se com o grupo vacina (figura 23).</p>

Produção de IFN- γ em homogenato de pulmão

Todos os grupos infectados, previamente vacinados ou não, produziram níveis elevados de IFN- γ , em comparação com o grupo controle constituído de animais normais. Os níveis de IFN- γ foram significativamente mais elevados nos grupos vacina (imunizado com DNAhsp65) e controle (infectado e não vacinado), comparativamente ao grupo BCG (figura 24).



	Cam 1	Cam2	Cam3	Cam4	Cam5	Cam 6	Média
Controle	0	0	0	0	0	0	0
Cont. Infec.	5,77	5,83	6,16	5,76			5,88
Vetor	5,58	5,61	5,48	5,07			5,43
Vacina	5,69	5,97	6,48	6,49	6,06		6,14
BCG	5,56	5,41	5,11	3,63	2,72	2,45	4,14
BCG / Vet	5,39	5,77	5,47	5,40	5,79	5,56	5,56
BCG / Vac	5,52	4,02	4,92	3,65	5,52	5,02	4,77

Figura 21: Log₁₀ de unidades formadoras de colônias (UFC) em pulmão de camundongos BALB/c imunizados ou não com vacina gênica (DNAhsp65) ou BCG e desafiados com *M. tuberculosis*. Média ± EPM de 4-7 animais. *p<0,05 em relação ao grupo controle infectado e vacina.

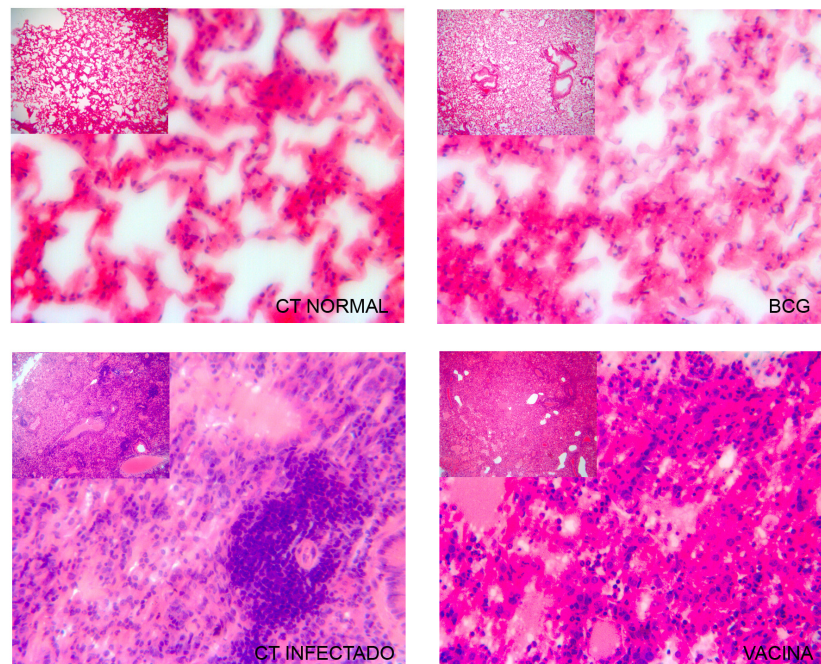


Figura 22: Fotomicrografia de cortes histológicos de pulmão de camundongos BALB/c submetidos à imunização com BCG (1 dose) no período neonatal seguida de DNAhsp65 (2 doses) no período adulto. Os animais foram sacrificados 30 dias após o desafio com *M. tuberculosis* via IT e o tecido pulmonar fixado em formol foi processado e corado com hematoxilina-eosina (HE). Animais não infectados (CT NORMAL), infectados (CT INFECTADO), imunizados com BCG antes da infecção (BCG) e imunizados com DNAhsp65 antes da infecção (VACINA). Aumento 40x (figuras maiores) e 10x (figuras menores).

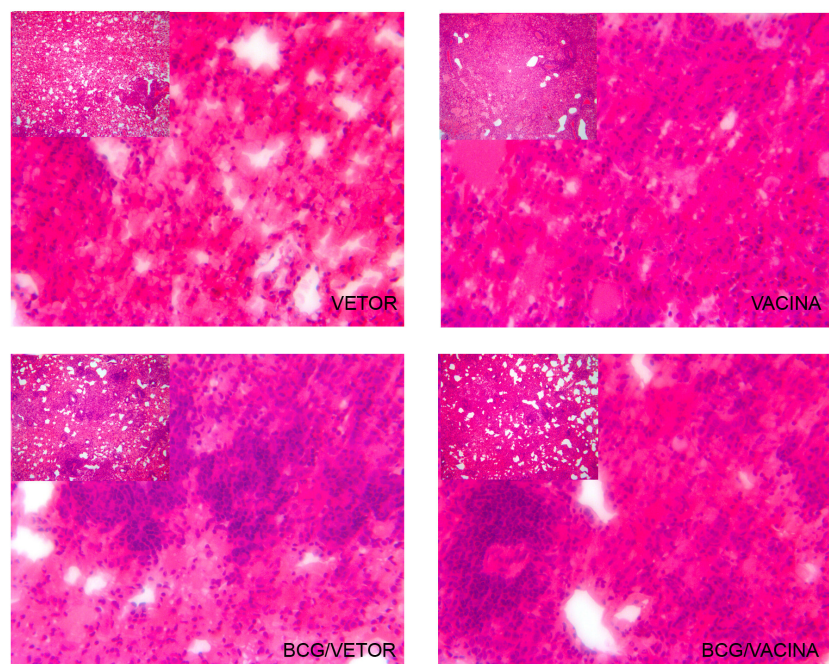


Figura 23: Fotomicrografia de cortes histológicos de pulmão de camundongos BALB/c submetidos à imunização com vetor (2 doses) ou DNAhsp65 (2 doses) no período adulto, BCG (1 dose) no período neonatal seguida de vetor (2 doses) ou DNAhsp65 (2 doses) no período adulto. Os animais foram sacrificados 30 dias após o desafio com *M. tuberculosis* via IT e o tecido pulmonar fixado em formol foi processado e corado com hematoxilina-eosina (HE). Animais injetados com vetor antes da infecção (VETOR), imunizados com DNAhsp65 antes da infecção (VACINA), imunizados com BCG antes da infecção seguido de vetor (BCG / VETOR) e imunizados com BCG seguido de DNAhsp65 antes da infecção (BCG / VACINA). Aumento 40x (figuras maiores) e 10x (figuras menores).

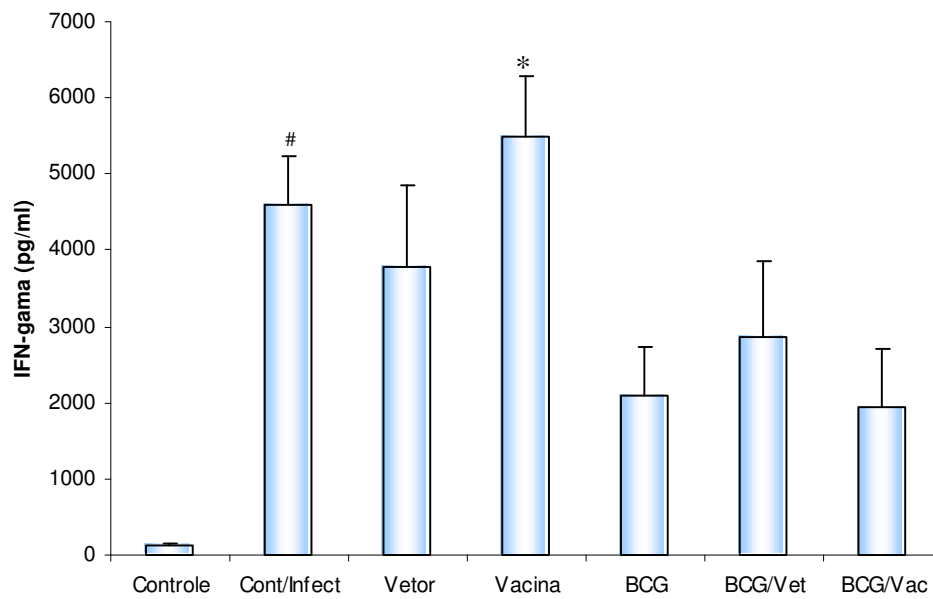


Figura 24: Concentração de IFN- γ em homogenato de pulmão de camundongos BALB/c imunizados com o protocolo tipo “prime-boost” BCG / DNAhsp65 e desafiados com *M. tuberculosis*. Média \pm EPM de 4-7 animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle infectado. # $p < 0,05$ em relação ao grupo BCG.

Discussão



V. DISCUSSÃO

Há uma década, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a tuberculose (TB) como sendo uma emergência global, sendo ainda hoje a maior causa de morte por doença infecciosa em adultos. A OMS estimou a ocorrência de 8,8 milhões de novos casos de tuberculose ativa no mundo somente no ano de 2003, com aproximadamente 1,7 milhões de mortes naquele ano [1].

Entre os países com maior incidência da doença está o Brasil. Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan/MS), são notificados anualmente 85 mil casos novos no Brasil. Assustadoramente, ocorrem cerca de 6 mil óbitos por ano em decorrência da doença [2].

Atualmente o BCG é a única preparação vacinal disponível para profilaxia da tuberculose, entretanto, segundo a OMS sua eficácia varia de 0 a 80%.

Em crianças, o BCG tem efeito protetor contra a TB, mas essa imunidade diminui com a idade resultando em proteção insuficiente ou ausente contra a tuberculose pulmonar em adultos [50]. A imunização de neonatos contra a TB, e também contra outros agentes infecciosos é um desafio, pois o sistema imune do neonato difere do adulto tanto em termos quantitativos quanto qualitativos. Neonatos montam uma resposta imune deficiente a qual tem sido atribuída principalmente às diferenças quantitativas na célula T comparada com as dos adultos [51].

A necessidade de uma nova vacina mais segura e eficaz para o controle profilático da TB é consenso na comunidade científica. Dentre as novas formulações propostas se destacam as vacinas gênicas, não só pela potente

resposta imune celular que induzem, como também pelo custo provavelmente mais baixo. Uma vacina de DNA, contendo o gene da hsp65 do *M. leprae*, é investigada aqui no Brasil, no Centro de Pesquisas de Tuberculose da Universidade de São Paulo/ USP - Ribeirão Preto. Foi comprovado anteriormente que esta vacina tem efeito profilático e terapêutico em modelo experimental murino de TB [30].

Neste contexto, o objetivo geral da presente investigação foi caracterizar a resposta imune de camundongos cuja imunização com a vacina DNAhsp65 foi realizada integral ou parcialmente na fase neonatal. Iniciamos este trabalho avaliando se a administração de diferentes doses da vacina DNAhsp65 no período neonatal induzia tolerância. A possibilidade de induzir tolerância no período neonatal é muito mais elevada do que no período adulto [36, 52]. Além disto, esta preparação vacinal por ser do tipo vacina gênica, possui um potencial tolerogênico a mais. Como a proteína codificada pela vacina de DNA é produzida endogenamente e expressa no contexto de MHC, a mesma pode ser reconhecida como própria, o que resultaria mais em tolerância do que em imunidade. Discute-se na literatura a possibilidade das vacinas genéticas induzirem tolerância através da produção prolongada do antígeno [16]. Além disso, dependendo da duração da tolerância induzida, esta pode afetar a indução de resposta imune no adulto. O conceito de tolerância foi ampliado nos últimos anos, mas classicamente pode ser descrito como ausência de resposta imune desencadeada pelo contato de antígenos com os linfócitos (B e T) específicos. Desta forma, para a confirmação da indução de tolerância, é necessário pelo menos um segundo contato do

sistema imune com o antígeno em condições imunogênicas, para caracterizar a existência de um estado de tolerância.

Para fazer essa avaliação, grupos de camundongos com 5 dias de idade foram imunizados com 1, 10 ou 50 µg de DNAhsp65 seguida de dois “boosters”, com 100 µg / camundongo, no período adulto (concentração comumente utilizada em animais adultos). A resposta foi avaliada através da produção de anticorpos anti-hsp65 (IgG1 e IgG2a) no soro dos animais imunizados (protocolo 1). Os resultados obtidos sugerem que não ocorreu indução de tolerância. Além disso, se observou que a maior concentração (50 µg) foi responsável por uma maior produção tanto de IgG1 quanto de IgG2a. A partir destes resultados, adotamos a concentração de 50 µg para imunização de neonatos nos experimentos posteriores; esta dose representa 50% da dose normalmente administrada no adulto.

A literatura aponta vários fatores que influenciam o desenvolvimento de tolerância neonatal, incluindo a natureza, concentração e o modo de apresentação do antígeno ao sistema imune e também a idade do hospedeiro [53, 54]. Existem também relatos citando a importância da dose da vacina a ser administrada e a via de inoculação mais adequada para uma ação eficiente da vacina [55].

No protocolo empregado por nós, priorizamos a idade e a concentração da vacina. Escolhemos o período de 5 dias de idade porque alguns relatos na literatura sugerem o período entre 2 – 5 dias como crítico para esta indução de tolerância. Ichino et al. [55] testaram, em camundongos neonatos, concentrações de 1, 10 e 100 µg de vacina de DNA codificando a proteína do circunsporozoítia da malária. Os autores observaram que 100% dos animais que receberam 100 µg

desenvolveram tolerância, 85% dos que receberam 10 µg e somente 40% dos que receberam 1 µg. Mor et al. [39], observaram que a imunização com vacina de DNA em modelo murino de malária induz tolerância quando administrada entre 2 - 5 dias de idade e que esta tolerância persistiu por mais de 9 meses.

Diante dos resultados obtidos no primeiro protocolo, mostrando que a vacina não desencadeou tolerância nos neonatos, o segundo passo foi investigar a presença de mensagem para hsp65 nos vários tecidos após a imunização por via intramuscular. A justificativa para este tipo de abordagem reside principalmente, no fato da vacina gênica poder se disseminar e, portanto transfectar, diferentes células e tecidos. Neste sentido é desejável que esta vacina atinja predominantemente os órgãos linfóides secundários nos quais ocorre interação celular e montagem da resposta imune e não os órgãos linfóides primários nos quais ocorre formação do repertório e deleção de clones autorreativos.

Com o protocolo experimental nº 2, avaliamos a presença de mRNA hsp65 em diferentes tecidos. Após a imunização dos camundongos neonatos (5 dias) com 50 µg da vacina, detectamos, através de RT-PCR, mensagem para hsp65 no músculo dos animais após 48h, 72h e 7 dias. Apenas em um animal não foi detectada mensagem para hsp65 no músculo após 7 dias. No sétimo dia foi detectada mensagem para hsp65 no fígado de um dos animais. Nos vários outros tecidos ou órgão avaliados, incluindo órgãos linfóides primários e secundários, não foi detectada mensagem para hsp65.

Estes resultados estão, pelo menos em parte, de acordo com alguns dados na literatura. Dupuis et al. [56] relataram que a injeção de 50 µl de vacina gênica

por dose resultou numa rápida dispersão do plasmídeo pelo músculo dos animais e em algumas horas, foi encontrado em células localizadas nas fibras musculares e nos linfonodos drenantes, no entanto, esses autores detectaram expressão do gene somente nos músculos. Consideramos a ausência de mensagem para hsp65 nos órgãos linfóides secundários (linfonodos poplíteos e baço) surpreendente, pois dados da literatura mostram que a imunização com vacinas gênicas por via intramuscular têm sido acompanhada da presença do plasmídeo nestes órgãos [57].

Por outro lado, a ausência de transcrição gênica da vacina no timo mostra que o plasmídeo não está chegando neste órgão, ou pelo menos não está sendo transcrito. Consideramos este resultado bastante interessante porque a presença da proteína imunizante neste órgão, poderia desencadear deleção clonal ou anergia nos clones específicos a exemplo do que ocorre com clones autorreativos [58]. Além disso, apesar da relevância deste tipo de investigação, a mesma não tem sido feita em neonatos. Os resultados referentes a medula óssea, por causa da degradação da maioria das amostras, não são conclusivos.

Vários grupos têm demonstrado a expressão de DNA em outros tecidos como pulmão e fígado [59, 60]. Coelho-Castelo et al. [57] relataram que após a imunização por via intramuscular o plasmídeo codificando a hsp65 pode ser capturado por células dendríticas da linhagem CD11b+ e linfócitos B, ambos na medula óssea ou nos linfonodos e por células dendríticas da linhagem CD11c+ principalmente nos linfonodos.

Tendo constatado que ocorria transcrição do gene e ativação da resposta imune no neonato imunizado com a vacina gênica utilizamos um terceiro protocolo cujo objetivo era determinar se a vacinação era eficaz quando administrada integralmente no neonato. Esta abordagem era importante porque uma nova vacina para tuberculose deverá, necessariamente, ser eficaz na infância. Para isto, empregamos um esquema de vacinação similar ao adotado para camundongos adultos, constituído de três doses de vacina gênica. A dose escolhida foi de 50 µg, ou seja, a metade da dose normalmente empregada em camundongos adultos. Outra adaptação também foi feita em função da maturação do sistema imune do camundongo. Como os animais atingem a fase adulta entre 4 e 6 semanas, as três doses foram administradas no período de amamentação: 5º, 12º e 19º dias. Animais adultos são imunizados a partir de 4 – 6 semanas e o intervalo entre as doses é de quinze dias. Decorridas três semanas após a última dose foram avaliadas as respostas celular e humoral (protocolo 3). O planejamento inicial previa a estimulação das culturas esplênicas com antígeno específico, ou seja, hsp65 recombinante. A utilização deste reagente, entretanto, tem sido muito criticada em função da contaminação do mesmo com grandes quantidades de LPS derivado de bactéria *E.coli* transformada com o gene da hsp65, pois esta contaminação dificulta a avaliação dos resultados. As tentativas de eliminação do LPS com reagentes químicos na ocasião destes ensaios forneceram preparações de hsp65 tóxicas para ensaios celulares *in vitro*. A não estimulação com rhsp65, pelas razões já explicitadas, acarretou uma perda importante de informações. Comparamos a resposta das culturas estimuladas com

ConA ou *S. aureus*, para tentar caracterizar uma possível polarização da resposta imune.

Em relação ao IFN- γ e IL-10, os três grupos experimentais produziram níveis similares destas duas citocinas. Entretanto, a produção de IL-4 e IL-5 foi claramente mais elevada no grupo vacinado do que nos grupos controles (vetor e injetado com PBS). Apesar destes resultados terem sido obtidos com um ativador policlonal, de início, consideramos esta elevada produção de IL-4 e IL-5 como um indício de polarização Th2, a qual tem sido descrita para neonatos murinos e humanos [31, 61]. Entretanto, quando analisamos a produção de anticorpos anti-hsp65 ocorreu tanto produção de IgG1 quanto de IgG2a, não caracterizando, portanto, polarização Th2. Além disso, observamos variabilidade acentuada nos resultados, principalmente nos níveis de IgG1 sendo que só 20% dos animais produziram níveis significativos de anticorpos. É possível que esta baixa resposta imune esteja associada ao repertório restrito de células B e à elevada suscetibilidade dos neonatos à tolerância de alta dose, pois foram injetados 150 μ g de DNA em um intervalo de 2 semanas [62, 63]. Outros fatores tais como ausência de sinais envolvidos na cooperação celular Th – B também podem afetar a produção de anticorpos. Células de camundongos neonatos são, por exemplo, deficientes em regular e expressar moléculas de MHC de classe II após ligação com BCR. Esta deficiência das células B dos neonatos pode resultar em uma fraca interação MHC / peptídeo, prejudicando a troca de sinais com as células T via TCR, sendo insuficiente para a interação T - B. Acredita-se que isto ocorra pela incapacidade das células T dos neonatos em regular a expressão de CD40L [64].

Além desses fatores, outros relacionados com aspectos técnicos, tais como: pequeno volume e concentração das doses, tamanho diminuto do quadríceps do neonato e numerosos detalhes de metodologia de imunização que afetam a eficácia das vacinas genéticas [65 - 67], poderiam contribuir para a variabilidade da resposta.

Na tentativa de esclarecer a ineficácia do protocolo de imunização integral no período jovem, avaliamos dois aspectos: produção de citocinas (IFN- γ , IL-4 e IL-12) e suscetibilidade à indução de tolerância nos três diferentes períodos.

A escolha destas citocinas se deve tanto ao papel fundamental que as mesmas desempenham na polarização das respostas imunes para Th1 e Th2 [68] quanto às alterações observadas na produção das mesmas em neonatos murinos e humanos [42, 51]. Esta comparação foi feita por análise da presença destas três citocinas em sobrenadantes de células esplênicas, obtidas de animais normais com 5, 12, 19 e 30 dias de idade. As culturas foram estimuladas com ConA, *S. aureus*, LPS e hsp65 recombinante (protocolo 4). Por ocasião da realização destes experimentos os quais foram realizados no final do projeto, já dispúnhamos de uma rhsp65 mais purificada, contendo concentração aceitável de LPS (8,3 UE / μ g). Observamos que tanto células de camundongos jovens, incluindo neonatos, quanto de adultos estimuladas com ConA produziram elevados níveis de IFN- γ , sem diferença estatística entre os grupos. Este dado é coerente com a literatura. Tem sido descrito que ativadores policlonais cuja atividade é independente do TCR, induzem níveis similares aos encontrados em adultos [51].

Os resultados obtidos sugerem que provavelmente as deficiências em células T de neonatos não se devem a defeitos intrínsecos da célula, mas a outros fatores como, por exemplo, ao nível dos sinais co-estimulatórios como tem sido demonstrado para proliferação e produção de IL-2 [51, 69, 70]. Nas células estimuladas com *S. aureus* e LPS observou-se diferença significativa entre jovens e adultos. No caso do LPS somente as células de animais adultos produziram IFN- γ . Um perfil bastante similar aos induzidos por LPS e *S. aureus* foi observado nas culturas estimuladas com rhsp65, ou seja, produção mais elevada de IFN- γ por células de adultos em comparação com os demais períodos.

O único estímulo que induziu níveis detectáveis de IL-4 foi ConA. Estes resultados mostram produção significativamente maior de IL-4 por células de camundongos jovens (19 dias) em comparação com células dos demais grupos. No 12^o dia também foi observada produção maior de IL-4, mas não foi constatada diferença estatística. A produção desta citocina pelos neonatos foi similar à observada nos animais adultos. A indução de IL-12 só foi observada nas culturas estimuladas com *S. aureus* e os resultados mostram claramente a produção desta citocina pelas células dos animais adultos, mas não pelas células dos neonatos ou jovens. Em resumo, o perfil de citocinas dos camundongos jovens mostrou baixa produção de IFN- γ e IL-12 e elevada produção de IL-4 condizente com um predomínio do perfil Th2 o que é coerente com a literatura [71].

O protocolo utilizado para avaliar a indução de tolerância nos três diferentes períodos baseou-se na produção de anticorpos (protocolo 5) que, de forma genérica, sugere não indução de tolerância. O fato de termos detectado níveis

mais elevados de IgG2a em animais primados no 5º dia e desse nível ter diminuído em animais cujo “priming” ocorria em períodos mais tardios (12, 19 e 30 dias) não foi entendido como indicativo de tolerância. Interessantemente o “priming” com DNAhsp65 no 19º dia e 30º dia foi menos eficiente do que os realizados no período neonatal (5 dias) e aos 12 dias após o nascimento. Como o intervalo de tempo entre a 1ª e a 2ª dose foi de 4 semanas para todos os grupos, excluimos a possibilidade de que estas diferenças fossem devidas ao intervalo de tempo entre as duas doses. Uma possibilidade interessante se refere ao efeito da idade do animal quando o mesmo foi primado com DNAhsp65. Explicações possíveis para o desencadeamento de um “priming” mais eficiente de produção de IgG2a no período neonatal (5 e 12 dias), em comparação com 19 e 30 dias poderiam ser, por exemplo: transfecção mais eficiente dos miócitos, indução mais eficiente de memória imunológica ou a produção mais prolongada de antígeno pelas células musculares dos animais jovens. Apesar destas hipóteses não terem sido investigadas por nós, alguns relatos mostram indução mais eficaz de memória em neonatos do que em adultos [61, 72]. Não podemos excluir a possibilidade de que fatores ambientais estejam modulando este fenômeno de produção diferencial de IgG1 e IgG2a.

Como o “priming” com DNA no neonato foi bastante eficiente em termos de indução de resposta imune, testamos o “priming” com BCG seguido de “boosters” com DNA. Esta estratégia nos pareceu importante por várias razões, mas a relevância maior dessa proposta reside no fato de grande parte da população já ter sido vacinada com BCG na fase neonatal. Além disso, alguns protocolos recentemente empregados, denominados “prime-boost”, baseados

na associação de vacinas gênicas com vetores bacterianos ou virais atenuados, entre os quais se encontra o BCG, mostraram-se altamente eficazes [22, 25, 73].

Como o BCG é administrado nas primeiras semanas de vida, foi escolhido um protocolo experimental que mimetizasse esta situação. Para isto, camundongos BALB/c recém-nascidos (5 dias de idade) foram imunizados com BCG por via intradérmica e posteriormente, a partir da 5ª semana de vida, ou seja, na fase adulta, receberam 2 doses de vacina gênica (DNAhsp65) por via intramuscular. Duas semanas após a última dose de DNA, os animais foram sacrificados e avaliados quanto a produção de citocinas por células esplênicas, estimuladas *in vitro* com ConA e *S. aureus* e quanto a concentração de anticorpos específicos no soro (protocolo 6).

Como não utilizamos o estímulo específico, a análise do padrão de citocinas, nos diferentes grupos experimentais, foi feita em função dos perfis de citocinas observados nas culturas estimuladas com ConA ou *S. aureus*. Para facilitar o entendimento dos resultados foram comparados, inicialmente, os níveis de citocinas e anticorpos entre os grupos PBS / vetor e PBS / vacina. Posteriormente o perfil de citocinas e de anticorpos no grupo PBS / vacina foi comparado com o grupo BCG / vacina. Estas comparações permitiriam definir se o BCG, administrado no neonato, afetava qualitativamente e quantitativamente a resposta imune induzida pelo DNA no adulto.

Os níveis de citocinas (mais IFN- γ e menos IL-4 e IL-5) associados com a produção tanto de IgG1 quanto de IgG2a no grupo PBS / vacina comparado

com PBS / vetor sugeriu estimulação concomitante de Th1 e Th2 com uma provável predominância do padrão Th1.

Os níveis de citocinas (iguais para IFN- γ e IL-10, menores para IL-4 e maior para IL-5), associados com aumento significativo tanto de IgG1 quanto de IgG2a, quando foram comparados os grupos PBS / vacina e BCG / vacina, sugeriam modulação positiva tanto de Th1 quanto de Th2. A manutenção dos níveis de IFN- γ e a queda nos níveis de IL-4 poderiam explicar este aumento de IgG2a. É possível que o aumento de IgG1 se deve a presença de níveis maiores de IL-5.

Juntos estes resultados indicam que o BCG administrado no período neonatal primou para uma resposta imune mais elevada no período adulto, sem ter, entretanto, mudado o perfil de resposta induzido pela vacina gênica que foi um padrão misto (Th1 + Th2). Este resultado foi muito similar ao descrito por Ota et al. [74]. Estes autores mostraram que o BCG aumentou a produção de citocinas e anticorpos induzidos por vacinas não relacionadas ao BCG. Surpreendentemente, mas de forma similar aos nossos resultados, ocorreu produção tanto de citocinas de padrão Th1 quanto de padrão Th2, sugerindo que a magnitude, mas não a qualidade da resposta imune neonatal foi influenciada pelo BCG.

Este protocolo de imunização faz parte do regime denominado “prime-boost”. Esta estratégia tem sido descrita como uma possibilidade bastante promissora na área de vacinologia [20]. Consiste em uma imunização combinada, isto é, uma associação de dois tipos distintos de vacina. Esta

imunização seqüencial tem sido descrita como capaz de induzir níveis muito aumentados e persistentes de TCD8⁺ e Th1 quando comparados com protocolo de reforço homólogo [75]. A eficácia destes protocolos em induzir imunidade protetora tem sido demonstrada em vários modelos de infecção experimental, tais como leishmaniose [22], malária [76] e infecções virais [77].

Neste contexto, como tínhamos observado um aumento significativo da imunogenicidade da DNAhsp65 nos animais primados com BCG, avaliamos a eficácia protetora deste protocolo. Para isto os diferentes grupos vacinados foram desafiados por via intratraqueal com 10⁵ unidades de *M. tuberculosis* (protocolo 7). A contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) no pulmão dos animais mostrou que o BCG, como esperado, diminuiu significativamente o número de UFC. Entretanto, a associação BCG / DNAhsp65 não foi protetora. Esses resultados são coerentes com a análise histopatológica realizada nos pulmões dos animais. O pulmão dos animais imunizados somente com BCG estava muito semelhante ao dos animais controle não infectados, com a estrutura do parênquima normal e sem a presença de processo inflamatório. Já os animais que receberam BCG / DNAhsp65, apresentavam o tecido pulmonar bastante comprometido, com processo inflamatório intenso e formações granulomatosas semelhantes às alterações observadas no grupo controle infectado.

É possível que esta não proteção se deva a presença, além da Th1 protetora, de uma forte resposta do tipo Th2 nos animais imunizados. Nossa expectativa era, entretanto, a de que esta resposta Th2 concomitante fosse benéfica no sentido de imunomodular a resposta imune pulmonar, evitando

lesões de hipersensibilidade tipo IV. Esta acentuada resposta Th2 foi, provavelmente, também responsável pela neutralização do efeito protetor mediado pelo BCG e esperado no grupo BCG / DNAhsp65.

A constatação de que a vacina DNAhsp65 impediu a proteção induzida pelo BCG merece atenção especial. Além da possibilidade já aventada (excesso de Th2 bloqueando o efeito protetor da Th1), também é possível que a vacina DNAhsp65 esteja induzindo um fenômeno semelhante ao descrito por Kock. Robert Koch observou que tanto humanos quanto animais com TB desenvolviam uma reação necrótica contra componentes do *M. tuberculosis* [78]. Este fenômeno de Kock não está esclarecido em termos de mecanismo, mas tem sido atribuído a uma resposta Th1 modificada [79]. Uma publicação recente aborda justamente a possibilidade de indução do fenômeno de Kock por imunização com vacinas gênicas. Taylor et al. [80] constataram presença de necrose pulmonar resultante do uso de vacinas gênicas construídas com genes de micobactérias (hsp60 e Ag 85).

O nível de atividade reguladora induzido pela vacina, associado com a indução de células T reguladoras, também vem sendo investigado como um fator modulador da eficácia da vacina [81, 82]. Neste contexto é discutido se uma atividade reguladora excessiva poderia inibir uma resposta Th1 protetora. O fato da hsp65 micobacteriana e do BCG induzirem ativação de células T reguladoras [83, 84] sugere que esta associação poderia induzir uma atividade T reguladora excessiva, afetando negativamente a eficácia do BCG.

Apesar da relevância, em potencial, de um protocolo tipo BCG / neonato seguido de DNA / adulto, o mesmo só foi testado recentemente em um modelo

de tuberculose bovina. Diferentemente dos nossos resultados, Buddle et al. [85], constataram proteção. Estes autores compararam os seguintes grupos experimentais: o primeiro foi imunizado com uma dose de BCG no período neonatal seguida de 2 doses de DNA micobacteriano (hsp65, hsp70 e Apa) no período adulto; o segundo grupo recebeu DNA no período neonatal e mais uma dose com 3 semanas de idade seguida de uma dose de BCG no período adulto; e o terceiro grupo recebeu somente BCG no período neonatal. Os grupos foram desafiados por via intratraqueal com *M. bovis* quando os bezerros tinham aproximadamente 17 semanas de idade. Quinze semanas após, os animais foram sacrificados e avaliados quanto a presença de lesões no pulmão. A porcentagem de lesões nos pulmões foi semelhante nos 3 grupos, cerca de 22-33% comparado ao grupo controle (100%). Houve evidências de redução na disseminação da doença para os linfonodos dos grupos vacinados com BCG e DNA. Não houve diferença entre os grupos DNA (“priming”) / BCG (“booster”) e BCG (“priming”) / DNA (“booster”) sugerindo que a estratégia mais prática de vacinação para o humano, BCG (“priming”) / DNA (“booster”) pode ser uma combinação efetiva.

Outras estratégias tipo “prime-boost” heterólogo, utilizando uma seqüência inversa a adotada por nós (“priming” com a vacina gênica primeiro), mostraram resultados promissores. Vordermeier et al. [86], trabalhando com TB bovina demonstraram que “priming” com vacina gênica contendo o mesmo antígeno micobacteriano (hsp65 de *M. leprae*) presente na vacina empregada por nós, associado a um “booster” com proteína purificada, resultou em resposta imune mais homogênea e elevada em comparação com a resposta

imune induzida só pela vacina gênica. Skinner et al. [87], também em estudos de TB bovina, mostraram que “priming” com vacina gênica contendo hsp65, hsp70 ou Apa, seguido de “booster” com BCG, protegeu os animais contra o desafio com a micobactéria.

Por outro lado, o uso de BCG isoladamente ou de associações entre BCG e outras preparações vacinais tem sido contestado, pois evidências indicam sua interferência no teste da tuberculina [86]. Entretanto, é provável que esta dificuldade possa ser mais facilmente vencida com pesquisas direcionadas para a descoberta de novos antígenos para diagnóstico do que para o desenvolvimento de novas vacinas contra TB. Esta opinião é compartilhada por vários pesquisadores [15].

A análise global dos resultados obtidos estimula várias especulações e abre inúmeras possibilidades para futuras investigações. Em termos de eficácia protetora, o protocolo BCG / DNA, nas condições testadas, não foi eficaz. É possível que o protocolo de “priming” do neonato com DNAhsp65 seguido de “boosters” com a mesma vacina no período adulto também não seja eficaz. Por outro lado, o “priming” do neonato com DNA foi extremamente eficiente. É possível que esta eficácia se deva, por exemplo, à indução de uma forte memória imunológica no neonato. Este aspecto poderia ser mais explorado tanto na continuidade dos estudos de vacinas para tuberculose como para outros agentes infecciosos. Discute-se atualmente a necessidade de uma reavaliação das características e do potencial de uma vacina para o controle da TB. Um dos aspectos mais polêmicos é a sugestão de que a vacina, além de induzir uma Th1, seja capaz de suprimir uma resposta Th2 pré-existente [79]. Neste sentido, a

associação de um “priming” com DNAhsp65 no neonato seguido da proteína purificada ou do próprio BCG parece promissora. Seria muito interessante não só entender o mecanismo envolvido neste “priming” como também tentar modulá-lo, com seqüências CpG por exemplo, para desviar este “priming” para o sentido Th1.

Avaliados no seu conjunto os resultados obtidos mostraram que a mensagem para a proteína vacinal apareceu no músculo e que a imunização com DNAhsp65 associada ou não ao BCG, induziu uma elevada resposta imune de padrão misto (Th1 / Th2). Além disso, o protocolo BCG no neonato seguido de DNAhsp65 no adulto não protegeu contra a infecção.

A partir desses resultados podemos concluir que esta vacina é imunogênica para neonatos, mas que o protocolo de imunização testado não induziu imunidade protetora contra a tuberculose experimental.

Referências Bibliográficas



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tuberculosis Fact Sheet nº104, revised April 2005. World Health Organization website.
2. Ministério da Saúde - Portal, 2005, website.
3. Abolhassani M, Lagranderie M, Chavarot P, Balazuc AM, Marchal G. *Mycobacterium bovis* BCG induces similar immune responses and protection by rectal and parenteral routes. *Infect Immun* 2000; 68(10): 5657-62.
4. Agger EM, Andersen P. A novel TB vaccine; towards a strategy based on our understanding of BCG failure. *Vaccine* 2002; 21(1-2): 7-14.
5. Goldsby, R. A. et. al. Resposta imune às doenças infecciosas. In:_. Kuby *Immunology*. 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company 2000; P. 425-48.
6. Silva CL, Bonato VLD, Lima KM, Coelho-Castelo AA, Faccioli LH, Sartori A, et al. Cytotoxic T cells and mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 197(1): 11-8.
7. MacGregor RR, Boyer JD, Ugen KE, Lacy KE, Gluckman SJ, Bagarazzi ML, et al. First humans trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. *J Infect Dis* 1998; 178(1): 92-100.
8. Kaufmann SH. Immune response to tuberculosis: experimental animal models. *Tuberculosis* 2003; 83(1-3): 107-11.

9. Liu MA. DNA vaccines: a review. *J Intern Med* 2003; 253(4): 402-10.
10. Brooks JV, Frank AA, Keen MA, Bellisle JT, Orme IM. Boosting vaccine for tuberculosis. *Infect Immun* 2001; 69(4): 2714-7.
11. Fine PE. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* 1995; 346(8986): 1339-45.
12. Kaufman SH. Heat shock protein and immune response. *Immunol Today* 1990; 11(4): 129-36.
13. Le TP, Coonan KM, Hedstrom RC, Charoenvit Y, Sedegah M, Epstein JE, et al. Safety, tolerability and humoral immune responses after intramuscular administration of a malaria DNA vaccine to healthy adult volunteers. *Vaccine* 2000; 18(18): 1893-901.
14. Hernandez-Pando R, Pavon L, Arriaga K, Orozco H, Madrid-Marina V, Rook G. Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection. *Infect Immun* 1997; 65(8): 3317-27.
15. Buddle BM, Wards BJ, Aldwell FE, Collins DM, de Lisle GW. Influence of sensitisation to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. *Vaccine* 2002; 20(7-8): 1126-33.
16. Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application and optimization. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 927-74.
17. Manam S, Ledwith BJ, Barnum AB, Troilo PJ, Pauley CJ, Harper LB, et al. Plasmid DNA vaccines: tissue distribution and effects of DNA sequence, adjuvants and delivery method on integration into host DNA. *Intervirology* 2000; 43(4-6): 273-81.

- 18.** Tadokoro K, Koizumi Y, Miyagi Y, Kojima Y, Kawamoto S, Hamajima K, et al. Rapid and wide-reaching delivery of HIV-1 env DNA vaccine by intranasal administration. *Viral Immunol* 2001; 14(2): 159-67.
- 19.** Slater JE, Paupore EJ, Elwell MR, Truscott W. Lipopolysaccharide augments IgG and IgE responses of mice to the latex allergen Hev b 5. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 977-83.
- 20.** Ramshaw IA, Ramsay AJ. The prime-boost strategy: exciting prospects for improving vaccination. *Immunol Today* 2000; 21(4): 163-5.
- 21.** Davis HL, Mancini M, Michel ML, Whalen RG. DNA-mediated immunization to hepatitis B surface antigen: longevity of primary response and effect of boost. *Vaccine* 1996; 14(9): 910-5.
- 22.** Gonzalo RM, del Real G, Rodriguez JR, Rodriguez D, Heljasvaara R, Lucas P, et. al. A heterologous prime-boost regime using DNA and recombinant vaccinia virus expressing the *Leishmania infantum* P36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 2002; 20(7-8): 1226-31.
- 23.** Pouniotis DS, Proudfoot O, Minigo G, Hanley JC, Plebanski M. A new boost for malaria vaccines. *Trends Parasitol* 2004; 20(4): 157-60.
- 24.** Woodland DL. Jump-starting the immune system: prime-boosting comes of age. *Trends Immunol* 2004; 25(2): 98-104.
- 25.** Schneider J, Gilbert SC, Blanchard TJ, Hanke T, Robson KJ, Hannan CM, et. al. Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat Med* 1998; 4(4): 397-402.

- 26.** Letvin NL, Montefiori DC, Yasutomi Y, Perry HC, Davies ME, Lekutis C, et al. Potent, protective anti-HIV immune responses generated by bimodal HIV envelope DNA plus protein vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(17): 9378-83.
- 27.** Excler JL, Plotkin S. The prime-boost concept applied to HIV preventive vaccines. *AIDS* 1997; 11(suppl A): 127-37.
- 28.** Kaufmann SH, Schoel B, van Embden JD, Koga T, Wand-Wurttenger A, Munk ME, Steinhoff U. Heat-shock protein-60: implications for pathogenesis of and protection against bacterial infections. *Immunol Rev* 1991; 121: 67-90.
- 29.** 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* 1999; 66(1): 573-81.
- 30.** Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VLD, Lima VMF, Faccioli LH, Stavropoulos E, et al. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* 1999; 400 (6741): 269-71.
- 31.** Kovarik J, Siegrist C. Immunity in early life. *Immunol Today* 1998; 19(4): 150-2.
- 32.** Qian JX, Lee SM, Suen Y, Knoppel E, van de Ven C, Cairo MS. Decreased interleukin-15 from activated cord versus adult peripheral blood mononuclear cells and the effect of interleukin-15 in upregulating antitumor immune activity and cytokine production in cord blood. *Blood* 1997; 90(8): 3106-17.

- 33.** Hunt DW, Huppertz HI, Jiang HJ, Petty RE. Studies of human cord blood dendritic cells: evidence for functional immaturity. *Blood* 1994; 84(12): 4333-43.
- 34.** Buzby JS, Lee SM, Van Winkle P, DeMaria CT, Brewer G, Cairo MS. Increased granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA instability in cord versus adult mononuclear cells is translation-dependent and associated with increased levels of a A + U-rich element binding factor. *Blood* 1996; 88(8): 2889-97.
- 35.** Forsthuber T, Yip HC, Lehmann PV. Induction of Th1 and Th2 in neonatal mice. *Science* 1996; 271(5256): 1728-30.
- 36.** Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 1953; 172(4379): 603-6.
- 37.** Ridge JP, Fuchs EJ, Matzinger P. Neonatal tolerance revisited: turning on newborn T cells with dendritic cells. *Science* 1996; 271(5256): 1723-6.
- 38.** Bot A, Bona C. Genetic immunization of neonates. *Microbes Infect* 2002; 4(4): 511-20.
- 39.** Mor G, Yamshchikov G, Sedegah M, Takeno M, Wang R, Houghten RA, et al. Induction of neonatal tolerance by plasmid DNA vaccination of mice. *J Clin Invest* 1996; 98(12): 2700-5.
- 40.** Bot A, Antohi S, Bona C. Immune response of neonates elicited by somatic transgene vaccination with naked DNA. *Front Biosci* 1997; 2: 173-88.
- 41.** Watts AM, Stanley JR, Shearer MH, Hefty PS, Kennedy RC. Fetal immunization of baboons induces a fetal-specific antibody response. *Nat Med* 1999; 5(4): 427-30.

42. Pertmer TM, Oran AE, Madorin CA, Robinson HL. Th1 genetic adjuvants modulate immune responses in neonates. *Vaccine* 2001; 19(13-14): 1764-71.
43. Barrios C, Brandt C, Berney M, Lambert PH, Siegrist CA. Partial correction of the Th1 / Th2 imbalance in neonatal murine responses to vaccine antigens through selective adjuvant effects. *Eur J Immunol* 1996; 26(11): 2666-70.
44. Martinez X, Brandt C, Saddallah F, Tougne C, Barrios C, Wild F, et. al. DNA immunization circumvents deficient induction of T helper type 1 and cytotoxic T lymphocyte responses in neonates and during early life. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(16): 8726-31.
45. Sarzotti M, Dean TA, Remington MP, Ly CD, Furth PA, Robbins DS. Induction of CTL responses in newborn mice by DNA immunization. *Vaccine* 1997; 15(8): 795-7.
46. Hassett DE, Zhang J, Slifka M, Whitton JL. Immune responses following neonatal DNA vaccination are long-lived, abundant, and qualitatively similar to those induced by conventional immunization. *J Virol* 2000; 74(6): 2620-7.
47. Bot A, Shearer M, Bot S, Avriette M, Garcia-Sastre A, White G, et al. Induction of immunological memory in baboons primed with DNA vaccine as neonates. *Vaccine* 2001; 19(15-16): 1960-7.
48. Nichols WW, Ledwith BJ, Manam SV, Troilo PJ. Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 772: 30-9.

- 49.** Gilkeson GS, Ruiz P, Phippen AM, Alexander AL, Lefkowitz JB, Pisetsky. Modulation of renal disease in autoimmune NZB / NZW mice by immunization with bacterial DNA. *J Exp Med* 1996; 183(4): 1389-97.
- 50.** Haile M, Källenius G. Recent developments in tuberculosis vaccines. *Curr Opin Infect Dis* 2005; 18(3): 211-5.
- 51.** Adkins B. T-cell function in newborn mice and humans. *Immunol Today* 1999; 20 (7) : 330-5.
- 52.** Silverstein AM, Segal S. The ontogeny of antigens-specific T cells. *J Exp Med* 1975; 142(3): 802-4.
- 53.** Maradon G, Rocha B. Activation and “deletion” of self-reactive mature and immature T cells during ontogeny of Mls-1a: implications for neonatal tolerance induction. *Int Immunol* 1994; 6: 1899-904.
- 54.** Sarzotti M, Robbins DS, Hoffman PM. Induction of protective CTL responses in newborn mice by a murine retrovirus. *Science* 1996; 271(5256): 1726-8.
- 55.** Ichino M, Mor G, Conover J, Weiss WR, Takeno M, Ishii KJ, Klinman DM. Factors associated with the development of neonatal tolerance after the administration of a plasmid DNA vaccine *J Immunol* 1999; 162(7): 3814-8.
- 56.** Dupuis M, Denis-Mize K, Woo C, Goldbeck C, Selby MJ, Chen M, et al. Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice. *J Immunol* 2000; 165(5): 2850-8.
- 57.** Coelho-Castelo AAM, Santos Junior RR, Bonato VLD, Jamur MC, Oliver C, Silva CL. B-lymphocytes in bone-marrow or lymph nodes can take up

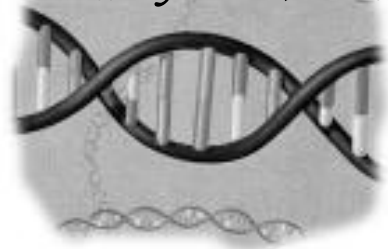
- plasmid DNA after intramuscular delivery. *Hum Gene Ther* 2003; 14(13): 1279-85.
- 58.** Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(10): 772-82.
- 59.** Hickman MA, Malone RW, Lehmann-Bruinsma K, Sih TR, Knoell D, Szoka FC, et al. Gene expression following direct injection of DNA into liver. *Hum Gene Ther* 1994; 5(12): 1477-83.
- 60.** Sikes ML, O'Malley BW Jr, Finegold MJ, Ledley FD. In vivo gene transfer into rabbit thyroid follicular cells by direct DNA injection. *Hum Gene Ther* 1994; 5(7): 837-44.
- 61.** Ota MOC, Vekemans J, Schlegel-Haueter S, Fielding K, Whittle H, Lambert PH, et al. Hepatitis B immunisation induces higher antibody and memory Th2 responses in new-borns than in adults. *Vaccine* 2004; 22(3-4): 511-9.
- 62.** Fadel S, Sarzotti M. Cellular immune response in neonates. *Int Rev Immunol* 2000; 19(2-3): 173-93.
- 63.** Bona C, Radu D, Kodera T. Molecular studies on the diversification of hemagglutinin – specific human neonatal repertoire subsequent to immunization with naked DNA. *Vaccine* 2004; 22(13-14): 1624-30.
- 64.** Marshall-Clarke S, Reen D, Tasker L, Hassan J. Neonatal immunity: how well has it grown up? *Immunol Today* 2000; 21(1): 35-41.
- 65.** Sanes JR, Johnson YR, Kotzbauer PT, Mudd J, Hanley T, Martinou JC, Merlie JP. Selective expression of an acetylcholine receptor-lacZ transgene in synaptic nuclei of adult muscle fibers. *Development* 1991; 113(4): 1181-91.

- 66.** Manthorpe MF, Cornefert-Jensen F, Hartikka J, Felgner J, Rundell A, Margalith M, Dwarki V. Gene Therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. *Hum Gene Ther* 1993; 4(4): 419-31.
- 67.** Levy MY, Barron LG, Meyer KB, Szoka FC. Characterization of plasmid DNA transfer into mouse skeletal muscle: evaluation of uptake mechanism, expression and secretion of gene products in blood. *Gene Ther* 1996; 3(3): 201-11.
- 68.** Liew FY. Th1 and Th2 cells: a historical perspective. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(1): 55-60.
- 69.** Adkins B, Ghanei A, Hamilton K. Up-regulation of murine neonatal T helper cell responses by accessory cell factors. *J Immunol* 1994; 153(8): 3378-85.
- 70.** Katamura K, Tabata Y, Oshima Y, Shintaku N, Yamauchi Y, Mayumi M. Selective induction of interleukin-4 and interferon- γ -producing T cells from cord blood naive T cells. Effects of costimulatory signaling through CD28. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 106(2): 101-6.
- 71.** Adkins B. Development of neonatal Th1 / Th2 function. *Int Rev Immunol* 2000; 19 (2-3): 157-71.
- 72.** Adkins B, Bu Y, Guevara P. The generation of Th memory in neonates versus adults: prolonged primary Th2 effector function and impaired development of Th1 memory effector function in murine neonates. *J Immunol* 2001; 166(2): 918-25.

- 73.** Ferraz JC, Stavropoulos E, Yang M, Coade S, Espitia C, Lowrie DB, et al. A heterologous DNA priming-*Mycobacterium bovis* BCG boosting immunization strategy using micobacterial hsp70, hsp65, and A pa antigens improves protection against tuberculosis in mice. *Infect Immun* 2004; 72(12): 6945-50.
- 74.** Ota MOC, Vekemans J, Schlegel-Haueter S. Influence of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin on antibody and cytokine responses to human neonatal vaccination. *J Immunol* 2002; 168(2): 919-25.
- 75.** Dunachie SJ, Hill AVS. Prime-boost strategies for malaria vaccine development. *J Exp Biol* 2003; 206: 3771-9.
- 76.** Degano P, Schneider J, Hannan CM, Gilbert SC, Hill AV. Gene gun intradermal immunization followed by boosting with modified vaccinia virus Ankara: enhanced CD8⁺ T cell immunogenicity and protective efficacy in influenza and malaria models. *Vaccine* 1999; 18(7-8): 623-32.
- 77.** Amara RR, Villinger F, Altman JD, Lydy SL, O'Neil SP, Staprans SI, et al. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* 2001; 292(5514): 69-74.
- 78.** Andersson J, Boasso A, Nilsson J, Zhang R, Shire NJ, Lindback S, et al. The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients. *J Immunol* 2005; 174(6): 3143-7.
- 79.** Rook GA, Dheda K, Zumla A. Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(8): 661-7.

- 80.** Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of *ex vivo* activated and expanded CD4⁺CD25⁺ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002; 99: 3493-9.
- 81.** O'Garra A, Vieira PL, Vieira P, Goldfeld AE. IL-10-producing and naturally occurring CD4⁺ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest* 2004; 114: 1372-8.
- 82.** Mills KH, McGuirk P. Antigen-specific regulatory T cells-their induction and role in infection. *Sem Immunol* 2004; 16: 107-117.
- 83.** Smit JJ, Folkerts G, Nijkamp FP. Mycobacteria, genes and the "hygiene hypothesis". *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4(1): 57-62.
- 84.** Durai M, Gupta RS, Moudgil KD. The T cells specific for the carboxyl-terminal determinants of self (rat) heat-shock protein 65 escape tolerance induction and are involved in regulation of autoimmune arthritis. *J Immunol* 2004; 172(5): 2795-802.
- 85.** Buddle BM, Skinner MA, Wedlock DN, de Lisle GW, Vordermeier HM, Hewinson RG. Cattle as a model for development of vaccines against human tuberculosis. *Tuberculosis* 2005; 85(1-2): 19-24.
- 86.** Vordermeier HM, Lowrie DB, Hewinson RG. Improved immunogenicity of DNA vaccination with mycobacterial hsp65 against bovine tuberculosis by protein boosting. *Vet Microbiol* 2003; 93(4): 349-59.
- 87.** Skinner MA, Buddle BM, Wedlock DN, Keen D, de Lisle GW, Tascon RE, et al. A DNA prime-*Mycobacterium bovis* BCG boost vaccination strategy for cattle induces protection against bovine tuberculosis. *Infect Immun* 2003; 71(9): 4901-7.

Lista de Abreviaturas



Lista de Abreviaturas

Ag: antígeno

ANOVA: análise de variância

APC: célula apresentadora de antígeno

BCG: Bacilo de Calmette-Guérin

BCR: receptor para antígeno em célula B

bp: pares de base

BSA: albumina sérica bovina

CD: célula dendrítica

cDNA: ácido desoxirribonucléico complementar

ConA: concanavalina A

Cont. Infec.: controle infectado

CpG: citosina – fosfato – guanina

CPT – FMRP / USP: Centro de Pesquisa de Tuberculose – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo

CT: controle

D. O: densidade óptica

DNA: ácido desoxirribonucléico

E. coli: Escherichia coli

EDTA: ácido etileno di-amino tetra-acético

ELISA: ensaio imunoenzimático

EPM: erro padrão médio

Fas / FasL: proteína Fas / proteína ligante de Fas

GM-CSF: fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos

HE: hematoxilina - eosina

HIV: vírus da imunodeficiência humana

Hsp: proteína do choque térmico

ID: intradérmica

IFN- γ : interferon - gama

IL-2, 4, 5, etc.: interleucina – 2, 4, 5, etc

IM: intramuscular

IT: intratraqueal

LB: meio Luria - Bertani

LPS: lipopolissacarídeo

M. bovis: Mycobacterium bovis

M. óssea: medula óssea

M. tuberculosis: Mycobacterium tuberculosis

M-CSF: fator estimulador de colônia de macrófagos

MHC: complexo principal de histocompatibilidade

mRNA: ácido ribonucléico mensageiro

MVA: “modified vaccinia virus Ankara”

OPD: ortho - phenilenediamina

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PMN: polimorfonuclear

PPD: derivado protéico purificado

rhsp65: proteína do choque térmico recombinante

RNA: ácido ribonucléico

RPMI: meio líquido para cultura de células (**R**oswell **P**ark **M**emorial Institute)

RT-PCR: reação de polimerase em cadeia precedida de transcrição reversa

S. aureus: Staphylococcus aureus

TAE: tampão tris acetato-EDTA

TB: tuberculose

Tc: célula T citotóxica

TCR: receptor para antígeno em célula T

TE: tampão tris-EDTA

Th1 / Th2: célula T “helper” 1 / T “helper” 2

TNF- α : fator de necrose tumoral α

UFC: unidade formadora de colônia

VAC: vacina

VET: vetor

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)