

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

**Efeito do adjuvante na modulação da resposta
imune induzida por antígenos secretados por
*Mycobacterium tuberculosis***

Denise Moraes da Fonseca

RIBEIRÃO PRETO
2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

DENISE MORAIS DA FONSECA

**Efeito do Adjuvante na Modulação da Resposta
Imune Induzida por Antígenos Secretados por
*Mycobacterium tuberculosis***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Mestre em Ciências
Área de concentração: Imunologia Básica e
Aplicada.

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

**RIBEIRÃO PRETO
2006**

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

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Fonseca, Denise Moraes da

Efeito do Adjuvante na Modulação da Resposta Imune Induzida por Antígenos Secretados por *Mycobacterium tuberculosis*

Ribeirão Preto, 2006.
117 pp. 28cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Área de Concentração em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Dra. Vânia Luiza Deperon Bonato Martins

1. Vacinas contra tuberculose. 2. Antígenos secretados por *M. tuberculosis*. 3. CpG Oligodeoxinucleotídeos. 4 Adjuvantes.

Dedicatória

Aos meus pais Manoel Neves da Fonseca e Leopoldina Morais da Fonseca e ao meu irmão José Luiz, a quem devo tudo o que sou, por me ensinarem que é possível alcançar os objetivos almejados. Por todas as privações e esforços dispendidos carinhosamente para minha formação.

Ao meu namorado, Alexander Galioti, pelo amor, paciência, compreensão e pelo exemplo de seriedade e organização. Pelo apoio e por todos os planos compartilhados...

A vocês, que sempre estiveram ao meu lado, dedico este trabalho...

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Vânia Luiza Deperon Bonato Martins, pela orientação, por tudo o que aprendi ao longo destes anos, pela valiosa contribuição para minha formação científica e pela disponibilidade, paciência, atenção e amizade;

Ao Prof. Dr. Célio Lopes Silva, pelo apoio incondicional e por disponibilizar toda a estrutura de seu laboratório para a realização dos experimentos;

À Prof^a Dr^a Arlete Aparecida Martins Coelho-Castelo, pela contribuição intelectual durante a realização deste trabalho;

À Dr^a. Alexandra Ivo de Medeiros e Dr^a Ana Paula Junqueira-Kipnis, pela preciosa contribuição com sugestões para a correção desta dissertação e pela disponibilidade e atenção com que discutiram o trabalho;

À Prof^a Dr^a Alexandrina Sartori, por todos os conhecimentos compartilhados, pela amizade e entusiasmo de sempre que me ensinaram a ter confiança em tudo o que fiz;

À Izaíra Tincani Brandão e Ana Paula Masson, pelo auxílio técnico durante os experimentos, pela paciência e amizade;

Ao Dr. Gilles Marchal, pela colaboração no projeto e por ceder os antígenos empregados nos ensaios experimentais;

A Dr^a Cinthya Horn, que intermediou a obtenção do antígeno PFC junto ao Dr. Gilles Marchal;

Ao Dr. Édson Garcia Soares, pela análise dos cortes histológicos;

À Ana Maria da Rocha, pelo auxílio técnico com a confecção dos cortes histológicos;

Aos docentes da área de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, responsáveis por grande parte do meu aprendizado. Pela competência com que mantêm o curso de pós-graduação;

Aos alunos e colegas da pós-graduação. Principalmente aos amigos do laboratório: Ana Paula Trobone, Ana Olímpia, Cássia, Anderson, Camila, Carlos Rodrigo, Deison, Eduardo, Fábio, Fabiane, Giovana, Luis Henrique, Juliana, Karla, Luciana, Marina, “Marininha”,

Patrícia, Priscilla, Rogério, Rubens, Sandra, Sheila, Sílvia, Tatiana, Tatiane, Thiago e Viviane, pelos conhecimentos compartilhados, pela companhia e pelos momentos de descontração;

A Tatiana, Marina, Priscilla e Luis Henrique, pela ajuda nos experimentos;

A Alexandra, Rogério e Valter, pelo auxílio com os experimentos envolvendo citometria de fluxo;

Ao Eduardo, pelo auxílio para fotografar as lâminas de histologia e por sempre estar disposto a ajudar em tudo o que foi necessário;

À Maria da Documentação Científica e ao Rogério Carvalho, pelo auxílio com a impressão do trabalho;

As secretárias Ana Cristine e Rosângela pelo exemplo de competência e dedicação à pós-graduação e pela amizade com que acolhe todos os alunos.

Ao Ronaldo, também pelos serviços de secretaria;

Aos colegas da administração do Centro de Pesquisas em Tuberculose (CPT) Ana, Ademir, Carlos, Fabiana, Helena, Marcos, Melissa e Rogério pelos serviços prestados que foram essenciais para este trabalho e por sempre estarem disponíveis em ajudar;

À FAPESP, CNPq, FAEPA e Rede TB pelo apoio financeiro durante a realização do projeto de pesquisa e à FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado (processo 03/11303-2).

A todos ...

Muito obrigada !

Poesia

*Gastei uma hora pensando um verso
que a pena não quer escrever.
No entanto ele está cá dentro
Inquieto, vivo.
Ele está cá dentro
e não quer sair.
Mas a poesia deste momento
Inunda a minha vida inteira*

Carlos Drummond de Andrade

*“Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não
conhece como eu mergulhei. Não se preocupe em entender,
viver ultrapassa qualquer entendimento.”*

Clarice Lispector

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	<i>i</i>
RESUMO	<i>iv</i>
ABSTRACT	<i>viii</i>
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 – Animais	24
3.2 - Vacina Experimental	24
3.2.1 - <i>Análise das proteínas em gel SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel eletrophoresis)</i>	24
3.2.2 – <i>Adjuvantes</i>	26
3.3 - Imunizações e grupos experimentais	27
3.3.1 - <i>Grupos experimentais e delineamento</i>	27
3.4 - Cultura das células do baço	28
3.5 - Preparo do inóculo de M. tuberculosis para desafio	28
3.6 - Desafio dos animais com M. tuberculosis	29
3.7 - Avaliação do pulmão dos animais desafiados	29
3.8 - Coleta, digestão e obtenção de células de pulmão	30
3.9 - Marcação das células para citometria de fluxo	31
3.10 - Determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC)	32
3.11 - Detecção de citocinas	33
3.12 - Ensaio Imunoenzimático ELISA para detecção de citocinas	33
3.13 - Ensaio imunoenzimático ELISA para detecção de anticorpos anti-PFC	35
3.14 - Detecção de óxido nítrico em homogenato de pulmão	35
3.15 – Histologia	36
3.16 - Análise estatística	36
3.17- Delineamento experimental	37
4. RESULTADOS	39
4.1 - Análise das proteínas presentes no filtrado de cultura de M. tuberculosis	39
4.2 - Padronização das imunizações com o antígeno PFC e o adjuvante CpG	42
4.2.1 – <i>Detecção de anticorpos anti-PFC</i>	42
4.2.2 <i>Detecção de citocinas em sobrenadantes de cultura de células do baço</i>	45
4.3 - Avaliação da indução de resposta imune humoral e celular após imunização de camundongos Balb/c	49
4.3.1 – <i>Detecção de anticorpos anti-PFC</i>	49
4.3.2 <i>Detecção de citocinas em sobrenadante de cultura de células do baço</i>	51
4.4 - Ensaio de proteção para avaliação da eficácia da vacina experimental	55
4.5 - Avaliação da resposta imune no pulmão dos animais desafiados	57

4.5.1 – Detecção de citocinas em homogenato de pulmão	57
4.5.2 – Detecção de óxido nítrico em homogenato de pulmão	62
4.5.3 – Análise do fenótipo celular em pulmão de camundongos BALB/c após o desafio	64
4.5.4 - Avaliação histopatológica do pulmão de camundongos BALB/c 70 dias após o desafio.....	76
5. DISCUSSÃO.....	83
6. CONCLUSÕES	101
<i>Referências Bibliográficas</i>	102
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
FLYN, J. L. and CHAN, J. Immunology of Tuberculosis. Annu. Rev. Immunol., v. 19: p. 93-129, 2001.	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Abreviaturas

ABREVIATURAS

Ag85B: Antigen 85B – Antígeno 85B

AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrome – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AIF: Freund's Complete Adjuvant – Adjuvante Completo de Freund

APC: Antigen Presenting Cell – Célula Apresentadora de Antígeno

BCG: Bacilo de Calmette-Guérin

BSA: Bovine Seric Album – Albumina Sérica Bovina

CAP: Calcium Phosphate Nanoparticles – Nanopartículas de Fosfato de Cálcio

CFP: Culture Filtrate Proteins – Proteínas de Filtrado de Cultura

CR: Complement Receptor – Receptor de Complemento

DC-SIGN: Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin

DDA: Dimethyldioctadecil Ammonium Bromide

DMT: Dimicolato de trealose

DNA: Deoxyribonucleic Acid – Ácido Desoxiribonucléico

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – Ensaio Imunoenzimático de Adsorção

ESAT-6: 6-kDa Early Secreted Antigen Target

Fc γ R: Receptor para a porção constante de IgG

HEL: Hen Egg Lysozyme – Lisozima de Ovo de Galinha

HIV: Human Immunodeficiency Virus – Vírus da Imunodeficiência Humana

IFN- γ : Interferon-gama

Ig: Immunoglobulin – Imunoglobulina

IL: Interleukin – Interleucina

iNOS: inducible Nitric Oxide Sintase

ISCOM: Immunostimulating Complexes – Complexos Imunoestimulatórios

LAM: Liporabinomanan – Liporabinomanana

LPS: Lipopolissacarídeo

M. leprae: *Mycobacterium leprae*

M. tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*

mAGP: Mycolyl arabinogalactan-peptidoglican

MHC: Major Histocompatibility Complex – Complexo Principal de Histocompatibilidade

MPL: Monofosforil Lipídio A

NK: Natural Killer

NO: Nitric Oxide – Óxido Nítrico

ODN: Oligodeoxynucleotides - Oligodeoxinucleotídeos

PAMP: Pathogen Associated Molecular Pattern – Padrão Molecular Associado ao Patógeno

PFC: Proteínas de Filtrado de Cultura

PBS: Phosphate Buffered Salin – Salina Tamponada com Fosfato

PRR: Pattern Recognition Receptors – Receptor de Reconhecimento Padrão

Quil-A: *Quillaria saponaria*

RD1: Region of Difference 1

RNA: Ribonucleic Acid – Ácido Ribonucleico

SPF: Specific Pathogen Free – Livre de Patógenos Específicos

SFB: Soro Fetal Bovino

TB: Tuberculose

TCR: T Cell Receptor – Receptor da Célula T

TGF: Tumoral Growth Factor – Fator de Crescimento Tumoral

Th: T helper – linfócito T auxiliar

TLR: Toll Like Receptors – Receptor do Tipo Toll

TNF: Tumoral Necrosis Factor – Fator de Necrose Tumoral

Tween: 20-polyoxyethylenesorbitan monolaurate

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

WHO: World Health Organization – Organização Mundial da Saúde

Resumo

RESUMO

A tuberculose (TB), doença causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, é considerada uma das maiores causas de mortalidade por doenças infecciosas no mundo. Embora exista a vacina BCG (Bacilo de Calmete-Guérin), usada para prevenção da TB, e terapia para os indivíduos que desenvolvem a doença, alguns fatores estão associados com a dificuldade em restringir o elevado número de casos, como: o abandono da quimioterapia, o surgimento de cepas multi-resistentes às drogas e a eficácia variável da vacina BCG. Esse contexto levou a necessidade de se desenvolver uma nova vacina contra TB, que seja mais eficiente que o BCG e segura para indivíduos imunocomprometidos. O objetivo deste trabalho foi testar uma estratégia profilática na TB experimental imunizando camundongos com uma solução de proteínas secretadas por *M. tuberculosis* (PFC- Proteínas de Filtrado de Cultura) administrada em presença de motivos CpG, como adjuvante. Camundongos BALB/c receberam 3 imunizações com intervalos semanais, por via subcutânea, com uma solução contendo 50 µg de PFC e 50 µg de CpG 1826. Como controles, grupos de animais receberam PFC emulsificado em adjuvante incompleto de Freund (AIF), PFC e CpG 2041 (não estimulatório) ou apenas PBS. A imunogenicidade das estratégias de imunização foi avaliada 15 dias após a última imunização através da detecção de anticorpos séricos e de citocinas produzidas por células de baço mediante estimulação *in vitro*. Para avaliação da eficácia protetora da preparação vacinal, os animais foram imunizados e, após 60 dias, desafiados por via intratraqueal com uma cepa virulenta de *M. tuberculosis*. Setenta dias após o desafio realizou-se o ensaio de proteção através da contagem do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC), a detecção de citocinas produzidas em homogenato de pulmão e avaliação do fenótipo celular no pulmão. Em relação aos ensaios de imunogenicidade, observamos que a imunização com o antígeno PFC acrescido de CpG 1826, CpG 2041 ou AIF induziu produção significativa de anticorpos IgG1 antígeno-específicos. Entretanto, apenas os animais imunizados com PFC e CpG 1826 sintetizaram níveis significativos do isotipo IgG2a. Esses animais também produziram concentrações mais elevadas de IFN- γ , enquanto a imunização com PFC em AIF induziu produção de IFN- γ , IL-5 e IL-10 por células de baço estimuladas com o antígeno específico *in vitro*. Contudo, após o desafio com *M. tuberculosis*, não verificamos proteção no grupo de animais imunizado com PFC e CpG 1826. No pulmão

desses animais, detectamos concentrações mais altas de IFN- γ e menores de TGF- β , além de um alto grau de comprometimento do parênquima pulmonar em relação ao grupo de animais imunizados com PFC em AIF, no qual houve uma redução significativa do número de UFC. Os animais imunizados apenas com o antígeno protéico, em presença de CpG 2041 que não possui efeito estimulatório, não apresentaram alteração na resposta imune induzida e no número de UFC em relação aos animais não imunizados e infectados. Na tentativa de otimizar a eficácia da imunização com PFC e CpG 1826, avaliamos também a via de imunização intranasal. Entretanto, camundongos que receberam PFC e CpG 1826 pela via intranasal apresentaram um aumento significativo no número de UFC. Dentro do contexto dos dados obtidos, discutimos neste trabalho a complexa relação *M. tuberculosis*-hospedeiro e suas conseqüências no desenvolvimento de vacinas contra a TB.

Abstract

ABSTRACT

A new vaccine against TB is required due to the variable efficacy of the current vaccine, the attenuated bacilli Calmete-Guérin (BCG) strain of *Mycobacterium bovis*. In this work, our aim was to evaluate the protective efficacy of a vaccine against experimental TB, based on Culture Filtrate Proteins (CFP) of *M. tuberculosis* plus CpG motifs, used as adjuvant. Initially, BALB/c mice were immunized by with 50 µg of CFP plus 50 µg of CpG 1826, 3 doses at 7 days-interval, by subcutaneous route. Control groups received CFP plus incomplete Freund adjuvant (IFA), CFP plus CpG 2041 (non-stimulatory) or PBS (non-immunized). After immunizations, we evaluated the immunogenicity of by the detection of antibodies anti-CFP and production of cytokines by spleen cells stimulated *in vitro*. After 60 days of the last immunization, mice were challenged with *M. tuberculosis* by intratracheal route and the protection was assayed by CFU (Colony Forming Units) counts. We also detected cytokine levels in the lungs and performed histological analysis 70 days post-challenge. We observed that immunization with CFP plus CpG 1826, CpG 2041 or IFA induced the production of anti-CFP IgG1 antibodies. However, only mice immunized with CFP plus CpG 1826 produced high levels of anti-CFP IgG2a antibodies. These mice also produced higher levels of IFN- γ than mice immunized with CFP plus IFA, after stimulation of spleen cells *in vitro* with CFP antigens. Despite of these results, mice immunized with CFP plus CpG 1826 were not protected after *M. tuberculosis* infection. In the lung of these mice, we detected higher levels of IFN- γ and lower levels of TGF- β in relation to mice immunized with CFP plus IFA. Histological analysis showed severe pulmonary injury associated with necrosis in the lungs of CFP plus CpG 1826 immunized mice. On the other hand, mice immunized with CFP plus IFA were protected after *M. tuberculosis* challenge and presented lesser pulmonary injury and lower number of CFU. Mice immunized with CFP, plus non-stimulatory CpG 2041, responded in a similar way on the non-immunized and infected mice. Taken together, our results showed that the immunization with CFP plus CpG 1826 stimulated a Th1 cellular immune response characterized by higher levels of IFN- γ in lung. However, this immunization was not able to induce protection against *M. tuberculosis* challenge, suggesting that other factors may be associated with protection besides IFN- γ .

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Tuberculose

A tuberculose (TB), doença respiratória causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, é responsável por 2 milhões de mortes ao ano. As estatísticas mostram que a TB permanece como uma das maiores causas de mortalidade por doenças infecciosas no mundo, ao lado da AIDS (do inglês, Acquired Immunodeficiency Syndrome) e da malária (WHO 2005; VON REYN & VUOLA, 2002; ANDERSEN, 2001). Dados da Organização Mundial da Saúde indicam que ocorrem de 8 a 9 milhões de novos casos de TB anualmente e cerca de um terço da população mundial encontra-se infectada pelo bacilo. O Brasil ocupa o 15º lugar entre os 22 países nos quais se estima que ocorram 80% dos casos de TB no mundo (WHO 2005; ROOK *et al.*, 2005a e 2005b; VON REYN & VUOLA, 2002; ANDERSEN, 2001; DYE *et al.*, 1999).

O bacilo *M. tuberculosis* é uma micobactéria intracelular facultativa de crescimento lento (NOLTE & METCHOCK, 1995; HOLT *et al.*, 1994). A transmissão da TB ocorre através da inalação de partículas, contendo a bactéria, que são expelidas em forma de aerossol por indivíduos com a doença ativa (RILEY *et al.*, 1959).

Apesar das estatísticas mostrarem que grande parte da população mundial já entrou em contato com o bacilo, uma parcela relativamente pequena dos indivíduos desenvolve a doença. Noventa por cento das pessoas infectadas desenvolvem uma forma latente e assintomática. Uma pequena porcentagem desses indivíduos (aproximadamente 10%) pode apresentar reativação da infecção, que poderia ser decorrente de uma infecção secundária, de um quadro de imunossupressão, desnutrição, consumo alcoólico, condições sanitárias precárias ou de um elevado grau de exposição. Essas situações podem resultar em TB ativa. Por outro lado, 5 a 10 % dos indivíduos infectados desenvolvem a doença progressiva logo após infecção primária (ROOK *et al.*, 2005b; FLYNN & CHAN, 2005; BOOM *et al.*, 2003).

A profilaxia da TB é realizada pela administração da vacina BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) que foi desenvolvida pelos pesquisadores Calmète e Guérin no Instituto Pasteur, em 1921 (CHUNG & BIGGERS, 2001; BANNON, 1999; BLOOM *et al.*, 1989). Essa vacina, empregada desde 1948, é constituída por uma cepa virulenta de *Mycobacterium bovis* que foi atenuada através da realização de várias culturas *in vitro* do bacilo.

O tratamento da TB é realizado por meio de quimioterapia, que combina o uso de diferentes antibióticos e tem duração de no mínimo seis meses. Por isso, é muito alto o número de casos de abandono do tratamento. Nos últimos anos, é grande a preocupação relacionada à eficácia desses antibióticos contra a doença devido ao aumento do número de pacientes portadores de cepas multi-drogas resistentes (WHO 2005; ZHU *et al.*, 2005).

Ativação da resposta imune na tuberculose

O estabelecimento da infecção pela micobactéria depende de seu encontro inicial com as células do hospedeiro, geralmente os macrófagos alveolares ou as células dendríticas (HINGLEY-WILSON *et al.*, 2000). Esta interação, que resulta na fagocitose do patógeno, caracteriza a etapa inicial de ativação da resposta imune inespecífica. A natureza dessa resposta imune dependerá da interação tanto das moléculas de superfície das micobactérias quanto dos receptores de reconhecimento padrão (do inglês PRR – Pattern Recognition Receptors) das células da imunidade inata.

A parede celular da micobactéria é composta basicamente por um complexo de ácidos micólicos, arabinogalactano e peptidoglicano (mycolyl arabinogalactan-peptidoglican mAGP) associados à liporabinomanana (LAM). Esses componentes ativam ou modulam negativamente a resposta imune do hospedeiro quando interagem com PRRs expressos na superfície de células da imunidade inata, como os macrófagos e as células dendríticas (FLYNN & CHAN, 2005). Os PRRs envolvem os receptores para componentes do sistema complemento, para manose, para proteínas surfactantes, o receptor CD14, que interage com a proteína que liga LPS (ERNEST, 1998). Além disso, foi descrito recentemente que os

Receptores Tipo Toll (TLR, do inglês Toll Like Receptors) interagem com uma variedade de moléculas expressas por micobactérias (FLYNN *et al.*, 2005; ABEL *et al.*, 2005; DRENNAN *et al.*, 2004; KAUFMANN & SHAIBLE, 2003; STENGER *et al.*, 2002; MEANS *et al.*, 1999; EHLERS *et al.*, 1998). Além desses receptores, o receptor para a porção constante de IgG (Fc γ R) também reconhece o complexo anticorpo-micobactéria.

Estudos *in vitro* mostram que quando o bacilo, opsonizado por anticorpos IgG, é fagocitado via Fc γ R ocorre ativação do macrófago e maturação do fagossomo (ERNEST, 1998). Se a micobactéria for internalizada através da interação de LAM com TLR2 ou TLR4, expressos nas células dendríticas e macrófagos, ocorrerá a produção de IL-12 e indução de resposta inflamatória (FLYNN *et al.*, 2005; ABEL *et al.*, 2005; DRENNAN *et al.*, 2004; KAUFMANN & SHAIBLE, 2003; STENGER *et al.*, 2002; MEANS *et al.*, 1999; EHLERS *et al.*, 1998). A resposta inflamatória também é induzida se a molécula LAM interagir com CD14 na superfície de macrófagos, desencadeando a produção de IL-8 e recrutamento de neutrófilos (PUGIN *et al.*, 1994). Por outro lado, pode ocorrer inibição da resposta inflamatória decorrente da produção de IL-10, por macrófagos ou células dendríticas, se houver ligação de LAM ao DC-SIGN (do inglês Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin), expresso em células dendríticas, ou com o receptor de manose, presente nos macrófagos (FLYN *et al.*, 2005; QUESNIAUX *et al.*, 2004; KARAKOUSIS *et al.*, 2004; KAUFMANN & SHAIBLE, 2003; TAILLEUX *et al.*, 2003; CHATTERJEE *et al.*, 1998). Além disso, se o bacilo for opsonizado pelos componentes C3b e C3bi do sistema complemento e fagocitado via receptores do complemento, como CR1, CR3 e CR4 (do inglês, Complement Receptor), haverá inibição da maturação do fagossoma e da ativação da cadeia respiratória, favorecendo a sobrevivência do bacilo (MALIK *et al.*, 2001; MALIK *et al.*, 2000). Portanto, o padrão de expressão dos PRRs e sua interação com o bacilo parece ser um dos fatores determinantes para ativação da resposta imune na TB.

Após a fagocitose, a maioria dos bacilos é degradada no interior dos fagolisossomos pelas enzimas lisossomais (FLYN & CHAN, 2005; FLYN & CHAN, 2001; HINGLEY-WILSON *et al.*, 2000). A presença de bacilos remanescentes e dos produtos

micobacterianos resultantes da degradação ativam os macrófagos alveolares, que secretam citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, IL-1, IL-8, MCP-1, MCP-3, IP10, RANTES, MIP1- α e MIP2, resultando no recrutamento de leucócitos para o local da infecção. Inicialmente, ocorre a migração de neutrófilos para o sítio da infecção, seguidos de monócitos que se diferenciam em macrófagos e de precursores de células dendríticas. (COSMA *et al.*, 2004; KAUFMANN, 2003; ORME, 2003; FLYNN & CHAN, 2001; DANNENBERG, 1993; ADAMS, 1976). Dentre estas células, os macrófagos são descritos como essenciais na indução da resposta imune contra TB, pelo fato de serem as células que contêm os bacilos e também por exercerem funções microbicidas. Além disso, os macrófagos atuam como células apresentadoras de antígenos e ativam a resposta imune adaptativa. Dentre as funções efetoras microbicidas exercidas pelos macrófagos, destacam-se, além da liberação de enzimas lisossômicas, a produção de intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio (FLYNN *et al.*, 2004; FLYNN *et al.*, 2001; COOPER *et al.*, 2000; McKINNEY *et al.*, 2000; ODDO *et al.*, 1998; SCHULLER-LEVIS *et al.*, 1994).

Apesar do macrófago ser caracterizado como uma célula efetora primária, o bacilo *M. tuberculosis* desenvolveu diversos mecanismos que permitiram sua sobrevivência e replicação no microambiente interno desta célula. Deste modo, a ativação inicial dos macrófagos pelos bacilos, na maioria das vezes, é insuficiente para eliminá-los e o controle da infecção requer a ativação da resposta celular imune específica, principalmente dos linfócitos T (FLYNN & CHANN, 2005; FLYNN *et al.*, 2004; BROWN & TAFFET, 1995; CLEMENS & HORWITZ, 1993; BERMUDEZ, 1993).

Os trabalhos realizados por North (1974), mostrando que camundongos isentos de linfócitos T eram mais suscetíveis à TB experimental e os estudos de Lefford e colaboradores (1974), comprovando que células T poderiam transferir imunidade, representaram um marco inicial na tentativa de se caracterizar as várias funções das subpopulações de linfócitos T na TB.

As infecções micobacterianas em indivíduos susceptíveis normalmente induzem uma intensa resposta de hipersensibilidade tipo IV, que resulta na formação de granulomas.

Estes granulomas constituem-se de uma área central de necrose circundada por macrófagos infectados. Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em menor quantidade, distribuem-se mais periféricamente, ao redor dos macrófagos. Além disso, ocorre um pequeno influxo de linfócitos B na periferia do granuloma. Na maioria das vezes, os macrófagos fundem-se formando as células gigantes (COSMA *et al.*, 2004; KAUFMANN, 2003; ORME, 2003; BOOM *et al.*, 2003; DANNENBERG 1993; ADAMS, 1976). A diferença entre os granulomas humanos e aqueles observados em camundongos, é que nos últimos dificilmente encontra-se necrose (KAUFMANN, 2003; ORME, 2003). Em hospedeiros com o sistema imune íntegro, os granulomas têm a função de evitar a expansão local e sistêmica do foco de micobactérias, ou seja, uma tentativa de isolar o foco infeccioso persistente.

O recrutamento de linfócitos T CD4⁺ é essencial para o desenvolvimento da imunidade protetora durante a infecção, uma vez que o habitat preferencial das micobactérias nos macrófagos é o fagossomo, o que resulta na apresentação de antígenos preferencialmente complexados às moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês Major Histocompatibility Complex) e ativação desta população de linfócitos. Além disso, pode ocorrer apresentação de antígenos via moléculas e classe I do MHC, ativando células T CD8⁺ conforme será abordado adiante.

Vários modelos experimentais utilizando linhagens de animais deficientes para a molécula CD4 ou eliminando-se as células T CD4⁺ pelo uso de anticorpos monoclonais comprovaram a importância destas células desde a fase aguda da infecção até os estágios mais crônicos da TB (SAUNDERS *et al.*, 2002; SCANGA *et al.*, 2000; CARUSO *et al.*, 1999). Linfócitos T CD4⁺ capazes de transferir imunidade aparecem nas primeiras semanas após infecção experimental (ORME *et al.*, 1992). Estas células, quando estimuladas *in vitro* com antígenos específicos, proliferam e secretam IFN- γ (GRIFFIN & ORME, 1994). Em humanos, observou-se que em indivíduos infectados com o vírus HIV, que apresentaram número reduzido de linfócitos T CD4⁺, havia um aumento significativo da susceptibilidade à TB (FLYNN, 2004; SELWYN *et al.*, 1989).

Após o recrutamento das células T CD4+ ocorre a ativação e migração de linfócitos T CD8+. A importância da subpopulação de linfócitos T CD8+ nas infecções micobacterianas foi descoberta nos últimos anos e, apesar da relutância em admiti-la, recentemente tem sido bastante referenciada. Modelos experimentais mostraram que animais deficientes em β 2 microglobulina, na molécula TAP (transportador associado com processamento de antígenos), em CD8, em moléculas de classe I do MHC ou em perforina foram todos mais susceptíveis à infecção com *M. tuberculosis* que os animais selvagens (SOUSA *et al.*, 1999; BEHAR *et al.*, 1999; COOPER *et al.*, 1997b; FLYNN, 1992). Diversos grupos de pesquisa identificaram, tanto em modelo experimental quanto em indivíduos com TB, a presença de linfócitos T CD8+ específicos para antígenos secretados por *M. tuberculosis*, como ESAT-6, CFP10, antígenos 85A e 85B, lipoproteína de 19kDa e proteína de 19kDa (SHAMS *et al.*, 2004; KAMATH *et al.*, 2004; SMITH *et al.*, 2000; GELUK *et al.*, 2000). Além disso, Brookes e colaboradores (2003) mostraram que células T CD8+ são capazes de eliminar as bactérias em cultura de macrófagos humanos infectados com *M. tuberculosis*, por um mecanismo dependente de contato celular com o envolvimento das moléculas CD95 e CD95L.

Os mecanismos efetores desencadeados pela ativação das células T CD8+ parecem prolongar a sobrevivência de animais infectados, pois na sua ausência, os camundongos tornavam-se mais suscetíveis à infecção, principalmente nos pulmões (FLYNN, 1992). Linfócitos T CD8+ também secretam IFN- γ e sugere-se que a lise de macrófagos infectados por linfócitos T CD8+ antígeno-específicos proporcione a liberação de micobactérias, que podem ser eliminadas após a fagocitose por macrófagos ativado por IFN- γ (ORME, 1992). Os mecanismos de lise e citotoxicidade mediados pelos linfócitos T CD8+ ocorre tanto pela via que envolve a exocitose de grânulos como perforina e granulicina, ou pela via que requer a ligação de CD95 (BROOKES *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2001; SERBINA *et al.*, 2000; STENGER *et al.*, 1998; LEWINSOHN *et al.*, 1998).

Células T “não convencionais” também podem estar envolvidas na resposta ao bacilo. Estas células podem ser linfócitos T $\gamma\delta$, específicos para fosfoantígenos micobacterianos, ou células NKT que reconhecem antígenos apresentados pela moléculas CD1. Células T $\gamma\delta$ ativadas por monócitos infectados por *M. tuberculosis*, secretam IFN- γ , podem lisar macrófagos infectados e controlar o crescimento da bactéria (ANGELINI *et al.*, 2004; DIELI *et al.*, 2001; TSUAKAGUCHI *et al.*, 1995; HAVLIR *et al.*, 1991).

Recentemente, tem-se abordado a importância das células NKT na TB experimental. Não existe um consenso sobre o papel dessas células durante a infecção. Apostolou e colaboradores (1999) observaram uma falha formação de granuloma em camundongos deficientes de células NKT (APOSTOLOU *et al.*, 1999). Também foi descrito que a ativação de células NKT com seu ligante natural, a α -galactosilceramidase, protege camundongos contra TB (CHACKERIAN *et al.*, 2002). Por outro lado, outros pesquisadores mostraram que não há diferença entre camundongos deficientes de células NKT e selvagens após desafio com cepa virulenta de *M. bovis* (KAWAKAMI *et al.*, 2002). Da mesma forma, a depleção dessas células em camundongos infectados com *M. tuberculosis* não ocasionou diferença no número de UFC no pulmão desses animais (JUNQUEIRA-KIPNIS *et al.*, 2003).

A contribuição das células B CD19+ na TB também permanece controversa. Camundongos deficientes de células B apresentaram aumento no número de UFC (Unidades Formadoras de Colônia) após desafio com *M. tuberculosis* em relação aos camundongos selvagens (VORDERMEIER *et al.*, 1996). Entretanto Johnson e colaboradores (1997) não observaram diferenças na UFC do pulmão de camundongos selvagens e deficientes de células B 45 dias após desafio com aerosol contendo baixo número de bacilos. Por outro lado, Bosio e colaboradores mostraram que linfócitos B possuem um papel protetor durante as fases mais iniciais da infecção. Neste trabalho, camundongos deficientes de células B apresentaram aumento do comprometimento

pulmonar e disseminação da bactéria quando comparados aos camundongos selvagens (BOSIO *et al.*, 2000).

Quanto às citocinas associadas à resposta protetora na TB humana e experimental, o IFN- γ apresenta papel essencial pelo fato de ativar mais eficientemente os mecanismos microbicidas dos macrófagos (FLYNN & CHAN, 2005; COOPER *et al.*, 1993; FLYNN *et al.*, 1993). As citocinas TNF- α e a IL-12 também estão relacionadas com proteção pelo fato de atuarem no recrutamento celular e na diferenciação de células T produtoras de IFN- γ , respectivamente (FLYNN, 2004; COOPER *et al.*, 1997; FLYNN *et al.*, 1993).

O IFN- γ estimula a expressão de MHC de classe I e II e de moléculas coestimulatórias na superfície das células apresentadoras de antígeno (APC), aumenta a fusão do endossomo ao fagolisossoma e a expressão da enzima iNOS (do inglês, inducible Óxid Nitric Synthase), responsável pela produção de Óxido Nítrico (NO, do inglês Óxid Nitric). Essa citocina também promove a troca de isotipo de imunoglobulinas para anticópos opsonizantes, como IgG2a em camundongo, que facilitam a fagocitose do bacilo (SALGAME, 2005; FLYNN, 2004; COOPER *et al.*, 1997; FLYNN *et al.*, 1995; FLYNN *et al.*, 1993). Camundongos deficientes de IFN- γ quando infectados apresentam uma doença mais grave acompanhada de aumento na mortalidade em relação a animais selvagens (PEARL *et al.*, 2001; FLYNN *et al.*, 1993; COOPER *et al.*, 1993).

A IL-12 é uma citocina essencial para a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ em Th1 (do inglês, T helper), produtores de IL-2, IFN- γ e TNF- β . Experimentos *in vitro* mostram que a IL-12 é secretada logo após a fagocitose do bacilo por macrófagos e células dendríticas (FLYNN *et al.*, 2003; TRINCHIERI, 2003; HENDERSON *et al.*, 1997; LADEL *et al.*, 1997). A administração de IL-12 recombinante a camundongos BALB/c, previamente infectados com o bacilo, aumentou a sobrevivência desses animais (FLYNN *et al.*, 1995). Além disso, camundongos deficientes de IL-12 são mais susceptíveis à TB (COOPER *et al.*, 1997a). Estudos realizados em populações humanas mostraram que a mutação no gene que

codifica a subunidade p40 da IL-12 ou no gene que codifica o receptor para esta citocina aumenta a susceptibilidade às infecções micobacterianas (OTTENHOF *et al.*, 1998).

Além da IL-12, trabalhos da literatura ressaltam o papel do TNF- α na formação e manutenção dos granulomas em camundongos e humanos (FLYNN & CHAN, 2005). Camundongos deficientes de TNF- α ou do receptor para esta citocina apresentaram defeito na formação de granulomas após a infecção com *M. tuberculosis* (SAUNDERS *et al.*, 2005; BEAN *et al.*, 1999; FLYNN *et al.*, 1995). Em camundongos com infecção crônica, a neutralização do TNF- α resultou na desorganização estrutural do granuloma, aumento da patologia e morte dos animais (MOHAN *et al.*, 2001). Em humanos, foi observado o aumento da susceptibilidade à TB após bloqueio da ação do TNF- α após o uso de anticorpos monoclonais anti-TNF- α para o tratamento da artrite reumatóide (FELDMANN & MAINI, 2001; RHOADES *et al.*, 1995).

Por outro lado, a produção exacerbada de outras citocinas como IL-4 e IL-10 resulta na dificuldade em controlar a infecção micobacteriana.

A IL-10 é uma citocina produzida por macrófagos e células dendríticas após interação com alguns componentes da micobactéria. Além disso, linfócitos T ativados também produzem IL-10. Essa citocina modula negativamente a resposta inflamatória e inibe a proliferação de células T, a produção de IL-12 e IFN- γ (ROJAS *et al.*, 1999; YSSEL & de VRIES, 1993; De WAAL MALEFYT *et al.*, 1991; FIORENTINO *et al.*, 1991). A IL-10 também regula negativamente a expressão de moléculas coestimulatórias e de classe I e II do MHC na superfície de APCs, além de inibir a produção de TNF- α e de óxido nítrico (TURNER *et al.*, 2002; ROJAS *et al.*, 1999; CHADBAN *et al.*, 1998; FLESCH *et al.*, 1994; De WAAL MALEFYT *et al.*, 1991). Camundongos deficientes de IL-10 apresentam aumento na imunidade contra a micobactéria associado a redução do número de bacilos no pulmão (MURRAY & YOUNG, 1999). Confirmando o papel imunomodulador desta citocina, animais transgênicos que expressam níveis aumentados de IL-10 são mais susceptíveis à TB em relação a camundongos selvagens (TURNER *et al.*, 2002).

A IL-4 é uma citocina característica da resposta imune de padrão Th2. Embora alguns trabalhos mostrem que a deficiência de IL-4 não interfere na progressão da TB, essa citocina possui um efeito deletério para a resposta imune do hospedeiro contra o bacilo (revisto por ROOK, DHEDA & ZUMLA, 2005; NORTH, 1998). A transferência de células T produtoras de IL-4 para camundongos infectados agravou a doença nos animais (WANGOO *et al.*, 2001). Além disso, em camundongos BALB/c, a presença de TNF- α tornou-se tóxica quando mais de dez por cento das células no local da infecção são produtoras de IL-4 (ROOK *et al.*, 2004; HERNANDEZ-PANDO & ROOK, 1994). A progressão da TB humana é acompanhada por aumento na produção de IL-4 secretada por células T CD4+ e CD8+. Além disso, parece haver uma correlação entre o aumento nos níveis dessa citocina com a severidade da doença (SMITH *et al.*, 2002; LIENHARDT *et al.*, 2002; VAN CREVEL *et al.*, 2000; SEAH, SCOTT & ROOK, 2000).

Dentro deste contexto, a compreensão da regulação da resposta imune durante a infecção natural pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias, como novas vacinas e imunoterapias, que permitam intervir na resposta contra *M. tuberculosis*. Em síntese, uma nova vacina contra a TB deverá estimular uma resposta imune, com indução de linfócitos T CD4+ e T CD8+ de memória, mais potente que a induzida pela infecção natural, sendo esta resposta associada com a produção de IFN- γ , IL-12, TNF- α , entre outros mediadores solúveis ou expressos na superfície celular, que estejam relacionados com a indução de respostas mediadas por células. Além disso, é preciso que haja produção de citocinas regulatórias, como a IL-10, para que a forte resposta celular induzida não provoque lesões, ou mesmo necrose, no tecido pulmonar.

Desenvolvimento de novas vacinas contra tuberculose

O desenvolvimento de uma cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, que provoca a TB bovina, por Calmette e Guérin no Instituto Pasteur em 1921, representou a descoberta de uma vacina para a TB humana (MARTÍN, 2005; BLOOM *et al.*, 1999; GRANGE *et al.*,

1993). Estima-se que mais de 2,5 bilhões de pessoas já tenham sido vacinadas (MARTÍN, 2005).

Esta vacina apresenta uma série de vantagens considerando-se uma população de indivíduos imunocompetentes. É uma preparação vacinal segura e, como imunógeno, estimula o desenvolvimento de memória imunológica de longa duração, variando de 5 a 50 anos, apenas com uma dose única de administração. Pode ser administrada ao nascimento, apresenta estabilidade ao calor na forma de vacina viva liofilizada e, sobretudo, é uma vacina cuja produção requer baixo custo (MARTÍN, 2005; O'DONNELL, 1997). Além disso, o BCG protege contra as formas mais graves de TB durante a infância, TB extrapulmonar e meningite, e também contra a hanseníase (MARTÍN, 2005).

Entretanto, a eficácia do BCG pode variar de 0 a 80%, dependendo da população estudada (COLDITZ *et al.*, 1994). A variabilidade na proteção conferida por essa vacina está associada a vários fatores: o contato prévio com micobactérias ambientais, principalmente nas regiões tropicais, as características genéticas das diferentes populações vacinadas, o fato do BCG ser produzido por laboratórios de diferentes países, além do fato dessa vacina estar sendo mantida em cultura há muitos anos, o que acarretou a perda de segmentos gênicos que poderiam ser imunogênicos (MARTÍN, 2005; BRITTON & PALENDIRA, 2003; VON REYN & VUOLA, 2002; BRANDT *et al.*, 2002; HESS & KAUFMANN, 1999). Além disso, a vacina BCG interfere nos testes de sensibilidade para detecção da doença, não apresenta proteção adicional com a administração de reforços da vacina e não é totalmente segura para indivíduos com AIDS, por ser uma vacina constituída de microorganismos vivos (BRITTON & PALENDIRA, 2003; HESS & KAUFMANN, 1999).

Dessa forma, nos últimos 8 anos, mais de 170 vacinas experimentais contra a TB foram testadas em modelos animais, muitas das quais encontram-se em fases de ensaio clínico (REED & LOBET, 2005; GINSBERG, 2002). Essas estratégias de imunização baseiam-se no uso de vacinas constituídas de microorganismos vivos recombinantes ou de vacinas de subunidades.

Vacinas de microorganismos vivos

As primeiras tentativas para o desenvolvimento de uma vacina contra TB envolviam o uso de microorganismos atenuados ou mortos (SMITH, 1985). Embora estimulassem a geração de memória imunológica de longa duração, não foram eficientes, pois induziam uma intensa resposta inflamatória, prejudicial ao hospedeiro. No período de 1950 a 1975, outras tentativas basearam-se em componentes da parede celular de micobactérias. No entanto, estes componentes geravam uma resposta inflamatória inespecífica e a eficácia de longa duração destas preparações passou a ser questionada (ORME, 1988).

As vacinas compostas de microorganismos vivos são uma alternativa interessante de imunização, pois induzem uma resposta imunológica celular e humoral, que pode ser de longa duração. Além disso, não necessitam de adição de adjuvante uma vez que os próprios componentes da bactéria possuem este papel. No entanto, oferecem alguns riscos, como reversão de virulência ou possível indução de patologia mediante situações de imunossupressão.

Dessa forma, avanços nos campos da bioinformática e da microbiologia molecular, juntamente com informações sobre o genoma das micobactérias, permitiram a atenuação direcionada das bactérias. Essas micobactérias atenuadas são cepas mutantes de uma bactéria virulenta que sofreram alteração em seu genoma de forma a deixarem de ser patogênicas (VON REYN & VUOLA, 2002). Além disso, essas tecnologias possibilitaram o desenvolvimento de microorganismos auxotróficos e recombinantes.

As bactérias auxotróficas são microorganismo que possuem uma alteração em um determinado elemento de uma via metabólica vital. Dessa forma, sobrevivem por curtos períodos no hospedeiro, mas o suficiente para induzir uma resposta imune protetora. Este tipo de vacinação representa uma estratégia interessante para indivíduos imunossuprimidos. Existem diversas vacinas constituídas de *M. tuberculosis* auxotrófico, como é o caso das cepas panCD (Pantotenato auxotrófico), leuD (Leucina auxotrófico), purC (Purina auxotrófico), proC (Prolina auxotrófico) e trpD (Triptofano auxotófico) (SAMPSON *et al.*,

2004; BRITTON & PALENDIRA, 2003; SAMBANDAMURTHY *et al.*, 2002; SMITH *et al.*, 2001; HONDALUS *et al.*, 2000; JACKSON *et al.*, 1999).

Outra estratégia de imunização envolve o uso de BCG recombinante. Neste caso, são inseridos na micobactéria genes que passam a expressar determinadas proteínas. Essas proteínas podem ser citocinas inflamatórias, como a IL-12, ou antígenos imunodominantes de *M. tuberculosis* (MARTÍN, 2005; REED & LOBET, 2005; ROOK, DHEDA & ZUMLA, 2005; e WILLIAMS *et al.*, 2005). Entre as várias cepas de BCG recombinante encontram-se: o rBCG30, que expressa o antígeno 85B (Ag85B) de *M. tuberculosis*; o BCG RD1, uma cepa de BCG na qual foram inseridos genes do complexo RD1 de *M. tuberculosis* e o BCG Δ ure-Hly que expressa a proteína listeriolisina de *Listeria Monocytogenes* e é deficiente da enzima uerase (HORWITZ & HARTH, 2003; PYM *et al.*, 2003; HORWITZ *et al.*, 2000; GRODE *et al.*, 2005).

Vacinas de subunidades

As vacinas de subunidades consistem no uso de um ou mais componentes da micobactéria. Esses componentes podem ser elementos da parede do bacilo, filtrados de cultura ou moléculas secretadas, como proteínas, carboidratos, lipoglicoproteínas e glicolípídeos (revisto por REED & LOBET, 2005). As estratégias utilizadas para a administração das vacinas de subunidade envolvem desde a simples injeção do antígeno acrescido de adjuvante, até o uso de vacinas gênicas.

Com a descoberta de técnicas de manipulação do DNA recombinante, o genoma de *M. tuberculosis* foi identificado, possibilitando a caracterização de inúmeros antígenos imunogênicos, e até mesmo imunodominantes, que se revelaram candidatos promissores para o desenvolvimento de vacinas contra a TB (COLE *et al.*, 1998). Dentro deste contexto, as vacinas de subunidades testadas contra TB, apesar de serem consideradas seguras, exigiam alto custo de produção. Além disso, este tipo de formulação revelou-se pouco imunogênico, sendo necessária a administração doses adicionais, ou reforços, além da utilização de adjuvantes eficazes que promovessem o desenvolvimento de resposta celular.

Neste ponto, encontra-se a maior desvantagem das vacinas de subunidades na profilaxia de infecções provocadas por patógenos intracelulares. A administração de uma vacina de subunidade acrescida dos adjuvantes disponíveis estimula preferencialmente a ativação de linfócitos T CD4+, que poderão se diferenciar em Th1 ou Th2, resultando na ativação de um padrão de resposta mista, humoral e celular.

Como se sabe, o sucesso das vacinas inativadas ou de subunidades disponíveis atualmente baseia-se na sua capacidade de induzir memória imunológica de longa duração. No entanto, a indução destas respostas de longa duração associa-se à ativação da resposta humoral, que é eficiente na eliminação de bactérias extracelulares e na neutralização de vírus. Para patógenos intracelulares, cujo controle da infecção requer a ativação de mecanismos mediados por células, ainda não existem vacinas eficientes disponíveis, com exceção às vacinas virais atenuadas.

Uma nova forma de vacinação, usando o DNA que contém o gene para o antígeno de interesse, tem sido bastante explorada na última década, pelo fato de estimular tanto a resposta humoral quanto a celular. Essas vacinas mimetizam os efeitos das vacinas vivas atenuadas por possibilitarem a geração de antígenos endógenos, e conseqüentemente, a ativação dos linfócitos T CD8+; atuam como adjuvante da resposta celular devido aos motivos CpG (GURUNATHAN, KLINMAN & SEDER, 2000). As vacinas de DNA foram e continuam a ser testadas em uma série de modelos de infecção experimental em camundongos e também em primatas não humanos, além de ensaios de fase clínica I (BAROUCH *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 1998; MANICKAN *et al.*, 1995).

O Centro de Pesquisas em Tuberculose da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CPT-FMRP-USP) estuda, tanto na área de pesquisa quanto na área de desenvolvimento, uma vacina de DNA baseada no gene que codifica a proteína de choque térmico de 65 kDa (hsp65) de *Mycobacterium leprae*. Esta vacina constitui-se do plasmídeo pcDNA3, que contém um gene para resistência à ampicilina, no qual foi clonado o gene da hsp65 (pcDNA3-hsp65). Quando administrada por via intramuscular em camundongos desafiados com *M. tuberculosis* ou previamente infectados com os bacilos por via

endovenosa, a vacina DNA-hsp65 apresentou efeito profilático e terapêutico, respectivamente (LOWRIE *et al.*, 1999; BONATO *et al.*, 1998). O efeito profilático desta vacina de DNA estava associado com a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4+ e T CD8+ que expressavam altos níveis do receptor de adesão CD44, além da atividade citotóxica, sendo o efeito protetor semelhante ao conferido pela vacina BCG (SILVA *et al.*, 1999; BONATO *et al.*, 1998). Utilizando um modelo de infecção intratraqueal, que se aproxima mais da via natural de infecção no homem, também foi avaliado o efeito terapêutico da vacina DNA-hsp65. Verificou-se uma redução significativa no número de UFC nos pulmões dos animais infectados e tratados com DNA-hsp65 que também apresentaram maior produção de IFN- γ e TNF- α e maior preservação do parênquima pulmonar em relação aos animais infectados e não tratados com DNA-hsp65 (BONATO *et al.*, 2004).

Outras vacinas de DNA que codificam diversos antígenos de *M. tuberculosis* como os antígenos 85B, 85A, MPT64, ESAT-6, Mtb72f, proteína de 38kDa, estão sendo testadas em modelo murino (LANGERMANS *et al.*, 2005; ZHU, JIANG & LUO, 2005; LUO *et al.*, 2004; BRANDT *et al.*, 2004; SKEIKY *et al.*, 2004; TSENOVA *et al.*, 2003; FONSECA *et al.*, 2001; BRANDT *et al.*, 2000).

Entretanto, parece que a eficácia protetora das vacinas de DNA em animais de pequeno porte, como os camundongos, não corresponde à proteção esperada quando determinadas preparações foram testadas em animais de maior porte, como os primatas não humanos (revisado por ORME, 2003 e 2005).

No sentido de otimizar as estratégias de vacinação, um novo conceito de imunização descrito recentemente é a imunização heteróloga ou “prime boost”. Nesta estratégia, os animais recebem a primeira imunização (“prime”) com uma vacina atenuada recombinante, que pode ser um vetor viral recombinante ou bactéria recombinante. Após o “prime”, o indivíduo recebe um reforço (“bost”), que é uma segunda imunização com o antígeno administrado por outra via, ou numa formulação diferente do “prime” (revisado por MARTIN, 2005; ANDERSEN & DOHERTY, 2005).

O uso de proteínas recombinantes também mostrou resultados promissores na proteção contra TB. Langermans e colaboradores (2005) descreveram que a imunização de camundongos e também de primatas não humanos com a proteína de fusão ESAT-6/Ag85B conferiu proteção contra TB (LANGERMANS *et al.*, 2005; OLSEN *et al.*, 2001). Outro candidato a vacina contra TB é o antígeno Mtb72f, uma combinação dos antígenos secretados Mtb32 e Mtb39, que quando acrescido do adjuvante AS02A mostrou efeito protetor em modelos de TB experimental com camundongos, cobaias, coelhos e primatas não humanos (BRANDT *et al.*, 2004; SKEIKY *et al.*, 2004; TSENOVA *et al.*, 2003).

Proteínas de filtrado de cultura de *M. tuberculosis*

Um fato importante a ser ressaltado em relação às vacinas de subunidades é que a maior parte das proteínas utilizadas nessas formulações, e que conferem proteção contra TB, são proteínas secretadas por *M. tuberculosis*.

Há alguns anos, vários grupos de pesquisa estudam a propriedade imunogênica dessas proteínas. Diversas frações foram caracterizadas por diferentes grupos de pesquisa. Entre elas encontram-se proteínas altamente imunogênicas, imunodominantes.

Dessa forma, as proteínas secretadas por micobactérias vivas representaram uma estratégia promissora para o desenvolvimento de vacinas contra TB. Essas proteínas são descritas como CFP (do inglês, Culture Filtrate Proteins). Alguns estudos mostraram que estas preparações foram capazes de conferir proteção, quando administradas em presença de adjuvante, contra desafio subsequente com *M. tuberculosis* (ANDERSEN, 1994), embora outros estudos descrevessem que a proteção não seria de longa duração como aquela induzida pelas vacinas vivas (ROBERTS *et al.*, 1995).

O primeiro trabalho descrito mostrou que uma vacina baseada em CFP e adjuvante DDA (Dimethyldioctadecil Ammonium Bromide) induziu nível de proteção comparável à da vacina BCG (ANDERSEN, 1994). Em trabalho anterior deste mesmo grupo, foi mostrado que células T associadas com proteção contra TB experimental eram direcionadas principalmente contra proteínas constituintes da preparação CFP (ANDERSEN & HERON,

1993). A imunização com CFP em modelo experimental de TB com cobaias também induziu resposta celular e proteção contra a doença (BEHAR *et al.*, 1999).

A partir da década de 90, com as primeiras evidências sobre a proteção conferida por esses antígenos, surgiram diversos trabalhos com o uso de formulações vacinais baseadas em proteínas secretadas por *M. tuberculosis* (BRANDT *et al.*, 2000; ROBERTS *et al.*, 1995; ANDERSEN, 1994; ANDERSEN & HERON, 1993; HUBBARD, FLORY & COLLINS, 1992). Nesses estudos foram empregados diferentes esquemas de imunização envolvendo o uso de diversos adjuvantes, como DDA, MPL (Monofosforil Lipídio A), DMT (Dimicolato de trealose), AIF (Adjuvante Completo de Freund) e citocinas (revisto por BRITTON & PALENDIRA, 2003; BRANDT *et al.*, 2000; ROBERTS *et al.*, 1995; ANDERSEN, 1994; ANDERSEN & HERON, 1993; HUBBARD, FLORY & COLLINS, 1992).

Adjuvantes

Além do tipo de antígeno administrado, a definição da natureza da resposta imune induzida é determinada pela escolha do adjuvante empregado na vacinação. Existem apenas três adjuvantes liberados para uso clínico: o Hidróxido de Alumínio, empregado na maior parte das vacinas (BUDDLE *et al.*, 2002; BREWER *et al.*, 1999); o MF59, que é uma emulsão de óleo em água empregada para vacinas contra influenza (PODDA & DEL GIUDICE, 2003), e os virossomos, que são estruturas similares a lipossomos contendo proteínas virais, também empregado em vacinas contra influenza e hepatite (HUCKRIEDE *et al.*, 2003). O grande empecilho é que esses adjuvantes liberados para uso em humanos promovem o desenvolvimento de uma resposta imune Th2. Para modelos experimentais existem vários adjuvantes capazes de desencadear resposta celular Th1, contudo, em função da sua elevada toxicidade, esses adjuvantes não são liberados para uso humano.

Diversos adjuvantes empregados em modelo animal encontram-se em fase de testes para uso clínico. Esses adjuvantes são: CAP (do inglês Calcium Phosphate Nanoparticles); LTK52, Lipovac, AS2, IC31, Montanide, ISCOM (do inglês, Immunostimulating Complexes) e OM-174 (revisto por DOHERTY & ANDERSEN, 2005). Com exceção do CAP e do Montanide,

os demais adjuvantes têm sido testados em modelos de TB por induzirem uma resposta Th1. O LTK63 é uma toxina modificada proveniente de *Escherichia coli* inicialmente testada em voluntários como uma vacina contra influenza (PEPPOLONI *et al.*, 2003). O Lipovac é uma emulsão estável contendo DDA e DMT, também chamado de fator corda, e tem mostrado grande eficácia e segurança em modelos animais (HOLTEN-ANDERSEN *et al.*, 2004). O AS2 é uma emulsão de óleo em água contendo o 3-deacetil-monofosforil-lipídeo A (MPL), proveniente de *Salmonella enterica*, e uma saponina purificada da casca da árvore *Quillaria saponaria* (Quil-A) (TIBERIO *et al.*, 2004). O ISCOM é uma formulação da saponina Qui-A, colesterol, fosfolipídeos e proteínas. O OM-174 é um lipídeo A de *E. coli* sintético, detoxificado e modificado (MOREIN *et al.*, 1999). E finalmente, o IC31 é uma mistura de oligodeoxinucleotídeos (ODN) e aminoácidos policatiônicos, que protegem os ODNs de degradação, e assim como os demais adjuvantes citados, desencadeiam uma forte resposta Th1 (MATTNER *et al.*, 2002; LINGNAU *et al.*, 2002)

Os ODNs sintéticos são testados em modelo animal já há alguns anos. Esses ODNs, também descritos como motivos CpG (CpG-ODNs), são definidos como seqüências de fita simples de DNA contendo uma citosina e uma guanina (motivo CG) não metiladas, flanqueadas por duas bases purinas na extremidade 5' e duas bases pirimidinas na extremidade 3' (GURUNATHAN, KLINMAN & SEDER, 2000; CHU *et al.*, 1997; BIRD, 1986). Os motivos CpG são encontrados na natureza em DNA de células procarióticas e são caracterizados como um tipo de PAMP (do inglês Pathogen Associated Molecular Pattern) por serem reconhecidos por TLR9, que por sua vez é classificado como um PRR. Os PRRs geralmente encontram-se expressos em células da resposta imune inata e reconhecem moléculas (PAMPs) que atuam no sentido de “alertar” o sistema imune para iniciar uma resposta. O TLR9 interage com os motivos CpG no retículo endoplasmático das células e desencadeia um sistema de sinalização intracelular via MyD88 e NF- κ B. Esta cascata bioquímica de ativação induz o aumento da expressão de moléculas de classe II do MHC e de moléculas coestimulatórias, como CD80 e CD86, CD40, e secreção de citocinas, como IL-12 e IL-6 por monócitos e macrófagos e de IFN- γ indiretamente por células NK, devido à síntese de

IL-12 (GURUNATHAN, KLINMAN & SEDER, 2000; KRIEG, Yi & HARTMANN, 1999; CHU *et al.*, 1997). Chu e colaboradores demonstraram que a imunização de camundongos BALB/c e B10.D2 com HEL (do inglês Hen Egg Lysozyme) acrescido de Adjuvante Incompleto de Freund levou à produção de IL-5 por células de baço cultivadas na presença do antígeno HEL. Quando esses animais foram imunizados com HEL e AIF acrescidos de motivos CpG, houve um aumento significativo da produção de IFN- γ e IL-12 por células de baço estimuladas com HEL (CHU *et al.*, 1997). Estes dados sugerem que a administração de motivos CpG *in vivo* pode levar a um direcionamento da resposta para um padrão celular, pelo fato dessas seqüências comportarem-se como um adjuvante para indução de resposta imune de padrão Th1.

Atualmente, foram sintetizadas e patenteadas classes distintas de seqüências CpG capazes de estimular tipos específicos de células do sistema imune. A seqüência CpG tipo “A” ativa a maturação de células APCs, induz a secreção de IFN- α por células dendríticas plasmocitóides, produção de TNF- α por plasmócitos e ativa células NKT a produzirem IFN- α e IFN- γ . A seqüência CpG descrita como tipo “B” é capaz de ativar a proliferação e secreção de citocinas por linfócitos B e por células dendríticas plasmocitóides (KRIEG, 2002; VERTHELYI *et al.*, 2001; HARTMANN *et al.*, 2000). Já a seqüência CpG tipo “C” estimula a secreção de IL-6 por linfócitos T e de IFN- α por células dendríticas plasmocitóides (HARTMANN *et al.*, 2003; MARSHALL *et al.*, 2003). Além disso, as existem seqüências sintetizadas capazes de ativar especificamente células de camundongo enquanto que outras são específicas para células humanas (KLINMAN *et al.*, 2001).

Nesse sentido, a utilização de seqüências CpG parece promissora na tentativa de modular a ativação da resposta imune frente a uma preparação antigênica usada como estratégia profilática contra TB. Como as proteínas secretadas por *M. tuberculosis* apresentam-se como antígenos importantes na resposta imune contra a TB, a adição do adjuvante CpG às proteínas CPF podem representar uma estratégia interessante na formulação de uma nova vacina contra TB.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia do adjuvante CpG-ODN em potencializar a imunogenicidade dos antígenos secretados por *M. tuberculosis*, como estratégia de vacinação na TB experimental.

Objetivos Específicos:

- A- Padronização dos esquemas de imunização com PFC e motivos CpG.
- B- Caracterização da indução de ativação da resposta imune pelo esquema de imunização proposto através da avaliação da produção de citocinas por células do baço e detecção de anticorpos séricos.
- C- Avaliação da eficácia protetora do esquema de imunização através do desafio com *M. tuberculosis*.
- D- Caracterização da resposta imune dos animais imunizados e posteriormente desafiados através da produção de citocinas no pulmão, do grau de diferenciação das células pulmonares e da análise histológica, comparando-a ao grupo de animais apenas infectados.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c, SPF (do inglês, Specific Pathogen Free), fêmeas com idade entre 6 e 8 semanas, provenientes do Biotério de Animais Isogênicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP – USP. Após o desafio com cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis*, os animais foram mantidos em isoladores, em laboratório de biossegurança nível III, adequado para a manipulação de animais infectados com esta bactéria, com livre acesso à água e ração.

3.2 - Vacina Experimental

A vacina experimental foi constituída de proteínas secretadas por *M. tuberculosis* (denominadas como PFC) acrescida de motivos CpG como adjuvante.

Os antígenos PFC (Proteínas de filtrado de cultura de *M. tuberculosis*) foram cedidos pelo Dr. Gilles Marchal, do Instituto Pasteur – Paris, França.

3.2.1 - Análise das proteínas em gel SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

Para análise do perfil das proteínas constituintes do filtrado de cultura de *M. tuberculosis* foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida. Após a montagem do sistema, fez-se a selagem das placas de vidro com gel de Agarose (GIBCO BRL) a 1% e adicionou 3 mL do gel de separação a 15% (o protocolo de preparo descrito a seguir). Adicionou-se logo em seguida 1 mL de água, que foi removida assim que ocorreu a polimerização do gel. Adicionou-se então 4 mL do gel de separação a 10% e, após a polimerização, o gel de empilhamento.

Gel de separação	10%	15%
Água destilada	1,25 mL	2 mL
Tris HCl (Invitrogen) (1,5M pH 8,8)	1,25 mL	1,25 mL
SDS (JT Baker) 10%	50 µL	50 µL
Bis/acrilamida 30% (Sigma)	2,5 mL	1,665 mL
Persulfato de amônio 10% (GIBCO)	25 µL	25 µL
TEMED (Ultra Pure, GIBCO)	20 µL	20 µL

Gel de empilhamento	
Água destilada	6,1 mL
Tris HCl (1,5M pH 8,8)	2,5 mL
SDS 10%	100 µL
Bis/acrilamida 30% (Sigma)	1,3 mL
Persulfato de amônio 10% (GIBCO)	50 µL
TEMED (Ultra Pure, GIBCO)	10 µL

Após polimerização do gel, as amostras foram ressuspensas em tampão de eletroforese 5 vezes concentrado (TrisBASE 5 M, 714 µL de 2-mercaptoetanol, 1,25 g de SDS e 5 mL de glicerol) e aquecidas até fervura por 2 minutos. Foram analisadas várias concentrações de PFC: 1 µg, 5 µg, 10 µg e 25 µg. O material foi submetido a eletroforese em tampão de corrida (Glicina 0,192 M, TrisBASE 0,025 M, SDS 0,1%, pH 8,3) por 2 horas a 60 V, utilizando o aparelho da Life Technologies Inc., Modelo 250 (BRL). O padrão de 1Kb Brench Mark™ Prestained Protein Ladder (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) foi utilizado como marcador de peso molecular e uma curva com diversas concentrações de soro albumina bovina (Pierce, Rockford, IL, USA) (1 µg, 2 µg, 5 µg e 10 µg) foi utilizada para quantificação das proteínas presentes nas bandas reveladas.

Após a eletroforese, o gel foi fixado e corado por impregnação com prata e a visualização das bandas foi feita no equipamento Image Master VDS (Hofer Pharmacia Biothec Inc. San Francisco, Califórnia, USA) com filtro amarelo (Keiko Co. Ltda). A imagem foi digitalizada e analisada em programa computacional, Image Master VDS Software, capaz de quantificar cada banda de acordo com o marcador de concentração (curva de BSA) e o peso molecular do padrão.

3.2.2 – Adjuvantes

Oligodeoxinucleotídeos

Oligodeoxinucleotídeos, também descritos como motivos CpG, foram sintetizados pela Invitrogen (Invitrogen Corp., Custom Primers – CA, USA) na escala de 1µmol de acordo com as sequências descritas a seguir, e contendo ligação fosfotioato em todas as bases, exceto na última.

Oligo CpG 1826: 5´ TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT 3´

Oligo CpG 2041: 5´ CTG GTC TTT CTG GTT TTT TTC TGG 3´

Devido a sequência de pares de bases CG presentes, o oligo CpG 1826 possui efeito imunoestimulatório para camundongos, ao contrário do oligo CpG 2041, usado como controle negativo nos grupos experimentais.

Adjuvante Incompleto de Freund

O Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) (Gibco BRL) foi utilizado como controle positivo nos grupos experimentais. O adjuvante foi preparado, de acordo com as orientações do fabricante, homogeneizando-se a proteína diluída em solução de PBS e o adjuvante numa proporção de 1:1 até a aquisição de uma emulsão homogênea e consistente.

3.3 - Imunizações e grupos experimentais

Os animais imunizados com PFC receberam 3 imunizações com intervalos de 7 dias, por via subcutânea na região dorsal, ou por via intranasal. Foram administrados, em cada dose, 50 µg de PFC juntamente com 50 µg de CpG 1826 ou CpG 2041, num volume final de 100 µL ou então, 50 µg de PFC em 50 µL de PBS juntamente com 50 µL de AIF. Como grupo controle, os animais receberam volume equivalente de PBS pelas vias subcutânea ou intranasal.

3.3.1 - Grupos experimentais e delineamento

Grupo	Imunização
Controle - PBS sc	Não imunizado (recebeu PBS por via subcutânea)
Controle - PBS in	Não imunizado (recebeu PBS por via intranasal)
PFC + CpG 1826 sc	50 µg de PFC+ 50 µg do oligo CpG 1826 – via subcutânea
PFC + CpG 1826 in	50 µg de PFC+ 50 µg do oligo CpG 1826 – via intranasal
PFC + CpG 2041	50 µg de PFC+ 50 µg do oligo CpG 2041 – via subcutânea
PFC + AIF	50 µg de PFC em Adjuvante Incompleto de Freund – via subcutânea

Inicialmente foi avaliada a imunogenicidade das preparações vacinais. Grupos de 5 camundongos BALB/c foram imunizados e, quinze dias após a última dose da vacina, os animais foram sacrificados. Foi coletado o soro para detecção de anticorpos anti-PFC e o baço para realização de cultura e dosagem de citocinas produzidas mediante estimulação com antígeno específico.

Para a avaliação do desenvolvimento de resposta protetora, grupos de camundongos BALB/c foram imunizados e desafiados com uma cepa virulenta de *M. tuberculosis* 60 dias após o final das imunizações. Setenta dias após o desafio, esses animais foram sacrificados para dosagem de citocinas em homogenato do pulmão, avaliação do fenótipo celular associado com memória imunológica e ativação celular, e determinação do número de UFC no pulmão.

3.4 - Cultura das células do baço

A cultura das células de baço foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Bonato e colaboradores (2001). Em síntese, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o baço foi coletado em 2 mL de meio RPMI-1640 Incompleto (Sigma) e mantido em gelo. Em câmara de fluxo laminar os baços foram divididos, as células obtidas contadas em câmara de Neubauer e diluídas em meio RPMI-Completo (Sigma) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (GIBCO; Grand Island, NY, USA), penicilina (100 µg/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e gentamicina 10 µg/mL (GIBCO; Grand Island, NY) para uma concentração final de 5×10^6 células/mL. O volume de 1 mL da suspensão celular foi distribuído em cada poço de placas de 24 poços (Costar) para posterior estímulo *in vitro* com 10 µg/mL de PFC, ou com 40 µg/mL do mitógeno concanavalina A (conA). Estas concentrações foram determinadas em experimentos prévios. Após 48 horas de cultura, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -70°C para dosagem de citocinas por ELISA.

3.5 - Preparo do inóculo de *M. tuberculosis* para desafio

A preparação do inóculo de *M. tuberculosis* H37RV (ATCC 27294) para infecção foi realizada a partir de uma alíquota de micobactérias congelada a -70°C (com viabilidade superior a 85%). Duzentos microlitros dessa alíquota foram distribuídos em 10 mL de meio Middlebrook 7H9 (DIFCO Laboratories, Detroit, MI, USA) enriquecido com Middlebrook ADCTM (BD Biosciences, Spark, USA), e incubado por 7 dias a 37°C . A suspensão de micobactérias obtida foi centrifugada a $3220 \times g$ por 20 minutos e o sedimento ressuspensionado em 2 mL de PBS estéril e agitado vigorosamente por 2 a 3 minutos em tubo contendo pérolas de vidro, até adquirir aspecto homogêneo. A viabilidade da cultura foi verificada, de acordo com a metodologia descrita por McDonough & Kress (1995), incubando-se por 10 minutos e a 37°C , 100 µL desta suspensão de bactérias com 100 µL de diacetato de fluoresceína, 2 µg/mL (Acros Organics, New Jersey, USA) e 100 µL de brometo de etídio, (10

mg/mL (Sigma, St. Louis, MO, USA). A seguir, a suspensão de micobactérias foi observada em microscópio de fluorescência modelo Aristoplan (Leitz Wetzlar, Germany). As bactérias viáveis apresentam coloração verde enquanto as bactérias mortas coram-se com a solução de brometo, apresentando-se com uma coloração avermelhada. As suspensões com viabilidade superior a 85% foram filtradas e sua concentração acertada de acordo com a escala nº1 de McFarland (1×10^7 bacilos/mL). Posteriormente, a concentração foi ajustada para 1×10^6 bacilos/mL. Todos os procedimentos de cultura da micobactéria, preparo do inóculo e desafio dos animais foram realizados em laboratório de biossegurança nível III.

3.6 - Desafio dos animais com *M. tuberculosis*

Cada animal foi desafiado com 100 μ L de suspensão contendo 1×10^5 bacilos de *M. tuberculosis* H37Rv por via intratraqueal, 60 dias após a última imunização. Para esse procedimento, os animais foram previamente anestesiados com uma solução de tribromoetanol (Acros Organics, New Jersey, USA) a 2,5% em PBS por via intraperitoneal. Após a anestesia, realizou-se o procedimento cirúrgico para exposição da traquéia e inoculação da bactéria. Como controle experimental, foi acrescentado um grupo que recebeu PBS por via intratraqueal em vez do desafio com a bactéria.

3.7 - Avaliação do pulmão dos animais desafiados

Setenta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e os pulmões coletados e colocados em placas de petri estéreis contendo 2 mL de meio RPMI-1640 Incompleto (Gibco BRL). Os pulmões foram pesados e tiveram seus lóbulos separados para os diversos procedimentos experimentais: o lóbulo superior direito foi colocado em um tubo contendo 10 mL de formol tamponado para posterior processamento e análise histológica; os lóbulos superior e inferior esquerdos foram coletados em tubos contendo 2 mL de RPMI-1640 incompleto e armazenados a -20°C para posterior detecção de citocinas; os lóbulos inferior e médio direitos foram coletados em placas de petri de 22 mm de diâmetro (Corning, NY,

USA) para obtenção de células para análise por citometria de fluxo e ensaio de proteção (UFC).

3.8 - Coleta, digestão e obtenção de células de pulmão

A obtenção das células do pulmão foi realizada de acordo com protocolo descrito por Bonato et al (2004). Os lóbulos inferior e médio esquerdos, destinados aos ensaios de UFC e de citometria de fluxo, foram pesados, cortados em pequenos fragmentos e transferidos para um tubo cônico (Falcon) de 50 mL contendo 15 mL da solução de digestão. Essa solução foi preparada em meio de cultura RPMI-1640 incompleto contendo 0,5 µg/mL de Liberase (Liberase Blendzyme – Roche, Indianapolis, IN) e 25 U/mL de Desoxiribonuclease I (Gibco BRL). Após a adição da solução de digestão, os tubos foram incubados a 37°C, sob agitação constante, durante 30 minutos. Após a digestão, as células foram dispersas com auxílio de uma seringa de 10 mL e centrifugadas a 453 x g, por 10 minutos, a 4°C. O sedimento foi ressuspensão em 1 mL de RPMI-1640 incompleto. Uma alíquota de 100 µL dessa suspensão foi retirada para o protocolo de UFC e o restante foi novamente centrifugado e o sedimento ressuspensão em 5 mL de meio RPMI-1640 contendo 10% de SFB para inibir a atividade da enzima liberase. As células presentes foram separadas do restante da matriz digerida utilizando-se uma malha de aço inox (Nylex screen – Sigma), seguida de lavagem da malha com mais 10mL de meio RPMI-1640. As células obtidas foram centrifugadas a 453 x g, por 10 minutos, a 4°C, ressuspensas em 1 mL de meio RPMI-1640 e contadas em câmara de Neubauer. A concentração final foi acertada para 1×10^7 células/mL. Essas células foram utilizadas para avaliação da expressão de marcadores de superfície por citometria de fluxo.

3.9 - Marcação das células para citometria de fluxo

As populações de células do pulmão de animais imunizados e desafiados foram caracterizadas pela expressão de marcadores de superfície utilizando anticorpos monoclonais específicos conjugados a fluorocromos.

As células obtidas após a digestão do pulmão foram distribuídas em tubos de poliestireno, 1×10^6 células em 100 μL por tubo, e incubadas durante 30 minutos, a 4°C , com anticorpo anti-CD16/CD32 (Fc BlockTM- PharMingen), na concentração de $0,5 \mu\text{g}/10^6$ células. Esta incubação visa minimizar as ligações inespecíficas. Posteriormente, essas células foram incubadas com os respectivos anticorpos monoclonais de interesse, de acordo com a tabela abaixo, ($0,5 - 0,75 \mu\text{g}$ de anticorpo/ 1×10^6 células) durante 30 minutos, a 4°C , no escuro. Após o tempo de incubação as células foram lavadas com 2 mL de PBS contendo 2% de SFB, centrifugadas a $453 \times g$, 4°C , por 10 minutos e ressuspensas em 300 μL de PBS contendo 1% de formol (Nuclear) para a fixação das células. As preparações celulares foram adquiridas em FACSortTM (Becton & Dickinson, San Diego, CA, USA). Foram adquiridas 10000 células por tubo, analisadas através do programa Cell Quest, de acordo com parâmetros de tamanho (FSC), granularidade (SSC) e intensidade de fluorescência dos anticorpos marcados com ficoeritrina (PE) e isotiocianato de fluoresceína (FITC). Inicialmente, foi determinada a população de linfócitos, baseada nos parâmetros FSCS e SSC, para detecção das porcentagens de linfócitos T ($\text{CD}4+$ e $\text{CD}8+$) e Linfócitos B ($\text{CD}19+$). Em seguida, avaliamos nessas populações a expressão de CD18, através da mediana da intensidade de fluorescência (MIF), e de CD44, através da porcentagem de células expressando $\text{CD}44^{\text{hi}}$. Além disso, também foram delimitadas as populações de macrófagos e células dendríticas, de acordo com os parâmetro de FSC e SSC, para detecção das porcentagens de macrófagos $\text{CD}11\text{b}+$ e células dendríticas $\text{CD}11\text{c}+$. Nestas populações, avaliamos a expressão de CD86 e da molécula de classe II do MHC através da MIF e da porcentagem de macrófagos e ou células dendríticas expressando essas moléculas.

Todos os anticorpos foram adquiridos da PharMingen e utilizados de acordo com as instruções do fabricante.

Marcação	
FITC	PE
Isotipo controle IgG2a rato Clone: R35-95	Isotipo controle IgG2a rato Clone: G155-178
CD3 – Clone: 145-2C11	CD19 – clone: 1D3
CD4 – clone: RM4-5	CD8 – clone: 53-6.7
CD18 – clone: C71/16	CD4 – clone: H129.19
CD18 – clone: C71/16	CD8 – clone: 53-6.7
CD18 – clone: C71/16	CD19
CD4 – clone: RM4-5	CD44 – clone: IM7
CD8 – clone: 53-6.7	CD44 – clone: IM7
CD19 – clone: 1D3	CD44 – clone: IM7
Isotipo controle IgG2b rato Clone: A95-1	Isotipo controle IgG hamster Clone: A19-3
CD11b – clone: M1/70	CD86 – clone: GL1
CD11c – clone: M1/70	CD86 – clone: GL1
CD11b – clone: HL3	Classe II – clone: AMS-32.1
CD11c – clone: HL3	Classe II – clone: AMS-32.1

3.10 - Determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC)

A partir da alíquota de 100µL do pulmão digerido foram feitas diluições em PBS de 10, 100, 1000 e 10000 vezes. As diluições (100 µL) foram plaqueadas em meio sólido 7H11, 7H9 (DIFCO Laboratories, Detroit, MI, USA) acrescido de ágar bacteriológico (Difco), adicionando-se 2 gotas de 50 µL em lados opostos 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 (Leica Microsystems, ZOOM 2000). O número de colônias foi corrigido de acordo com as diluições e o peso dos pulmões e expresso em Log₁₀ do número de UFC por grama de pulmão.

3.11 - Detecção de citocinas

A detecção de citocinas foi realizada no sobrenadante de cultura de células do baço dos animais imunizados e no homogenato do pulmão dos animais imunizados e desafiados.

Para a detecção das citocinas presentes no pulmão dos animais, foram coletados os lóbulos superior e inferior esquerdos e colocados em um tubo contendo 2 mL de meio RPMI-1640 incompleto, pesados e armazenados a -20°C . Os lóbulos foram descongelados e homogeneizados com auxílio de homogeneizador mecânico, modelo Ultra-Turrax T8 (IKA-WERKE), centrifugados a $3220 \times g$ por 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi coletado e armazenado a -70°C para posterior detecção de citocinas por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

3.12 - Ensaio Imunoenzimático ELISA para detecção de citocinas

A produção de citocinas sobrenadante de cultura de baço e em homogenato de pulmão foi avaliada por ELISA. Placas de 96 poços de poliestireno (Maxisorp Nunc-Immuno Plates, Rochester, NY, USA) foram sensibilizadas com 100 μL da solução de anticorpo monoclonal purificado específico para a citocina de interesse (PharMingen, San Diego, CA, USA - citados na tabela abaixo), diluído em tampão de ligação (Na_2HPO_4 0,1 M, pH 9,0) numa concentração final de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As placas foram incubadas a 4°C durante uma noite e posteriormente lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (Vetec Química Fina Ltda) e bloqueadas com 200 $\mu\text{L}/\text{poço}$ com uma solução de PBS contendo 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco BRL) (PBS/SFB 10%). Após incubação por 1 hora, a temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas. As amostras foram adicionadas, 100 $\mu\text{L}/\text{poço}$, juntamente com a curva padrão de citocina recombinante, diluída na base 2 em PBS/SFB 10% / Tween 0,05%, e incubadas por uma noite, a 4°C . Após lavagem, foi feita incubação por 1 hora, a temperatura ambiente, com anticorpo monoclonal conjugado com biotina específico para a citocina de interesse (PharMingen, San Diego, CA, USA), adicionando-se 100 $\mu\text{L}/\text{poço}$ do anticorpo diluído em PBS / SFB 10% / Tween 20 0,05% numa concentração final de

0,5 µg/mL. Decorrido o período de incubação, procedeu-se mais uma etapa de lavagem e adicionou-se 100µL/poço de solução de avidina biotina peroxidase StrepAB kit™, diluída 1000 vezes (Dako, Carpinteria, CA, USA) e incubou-se por 30 minutos a temperatura ambiente. As placas foram reveladas pela adição do substrato OPD (Sigma, St. Louis, MO, USA) após procedimento de lavagem. A reação foi finalizada pela adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico 16% (Merck & Co. Inc.). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de placa (µQuant Bio-Tek Instruments Inc.) em 490nm. A determinação das concentrações das citocinas foi feita por interpolação dos resultados de absorbância obtidos nas amostras em relação aos da curva padrão. Todos os anticorpos e citocinas recombinantes foram adquiridos da PharMingen e utilizados de acordo com as instruções do fabricante. Os limites de detecção das citocinas foram: 78 pg/mL para IFN-γ e IL-12, 39 pg/mL para IL-5 e 19,5 pg/mL para IL-4, IL-6 e IL-10. E o ponto mais concentrado da curva para IL-5, IL-6, IL-10, e IL-12 foi de 10000 pg/mL e para IFN-γ e IL-4 foi de 5000 pg/mL.

	Anticorpo Purificado	Anticorpo Biotinilado
IFN-γ	Clone: R4-6A2 Isotipo: IgG1 de rato	Clone: XGM1.2 Isotipo: IgG1 de rato
IL-2	Clone: JES6-1A12 Isotipo: IgG2a de rato	Clone: JES6-5H4 Isotipo: IgG2b de rato
IL-4	Clone: 11B11 Isotipo: IgG1 de rato	Clone: BVD6-24G2 Isotipo: IgG1 de rato
IL-5	Clone: TRKF5 Isotipo: IgG1 de rato	Clone: TRFK4 Isotipo: IgG2a de rato
IL-6	Clone: MP5-20F3 Isotipo: IgG1 de rato	Clone: MP5-32C11 Isotipo: IgG2a de rato
IL-10	Clone: JES5-2A5 Isotipo: IgG1 de rato	Clone: SXC-1 Isotipo: IgM de rato
IL-12/ p70	Clone: 9A5 Isotipo: IgG2b de rato	Clone: C17.8 Isotipo: IgG2a de rato

3.13 - Ensaio imunoenzimático ELISA para detecção de anticorpos anti-PFC

A produção de anticorpos específicos anti-PFC foi avaliada por ELISA a partir dos soros pré-ímmunes e soros coletados duas semanas após a última imunização. Placas de 96 poços de poliestireno (Maxisorp Nunc-Immuno Plates, Rochester, NY, USA) foram sensibilizadas com 100µL de solução de proteínas, diluídas em tampão de ligação (Na_2CO_3 14,3mM e NaHCO_3 10,3Mm pH 9,6) numa concentração final de 2,5 ou 5 µg/mL. As placas foram incubadas a 4°C durante uma noite e posteriormente lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (Vetec Química Fina Ltda) e bloqueadas com 200 µL/poço com uma solução de PBS contendo 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco BRL) (PBS/SFB 10%). Após incubação por 1 hora, a 37°C, as placas foram novamente lavadas e as amostras (soros) foram adicionadas, 100µL/ poço diluídas 1:50, 1:100, 1:500 e 1:1000, e incubadas por 2 horas a 37°C. Após lavagem das placas, foi realizada incubação por 1 hora, a 37°C, com anticorpo monoclonal anti-IgG1 ou anti-IgG2a conjugados com biotina (PharMingen, San Diego, CA, USA), adicionando-se 100 µL/poço do anticorpo diluído em PBS/SFB10%/Tween 20 0,05% numa concentração final de 0,5 µg/mL. A solução de avidina biotina peroxidase StrepAB kit™ (Dako, Carpinteria, CA, USA) foi adicionada (100 µL/poço) após procedimento de lavagem, sendo incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. As placas foram reveladas pela adição do substrato OPD (Sigma, St. Louis, MO, USA) e a reação foi finalizada pela adição de 50µL/poço de ácido sulfúrico 16% (Merck & Co. Inc.). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de placa (µQuant Bio-Tek Instruments Inc.) em 490nm. Todos os anticorpos utilizados foram adquiridos da PharMingen e utilizados de acordo com as instruções do fabricante.

3.14 - Detecção de óxido nítrico em homogenato de pulmão

A detecção da produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada através da dosagem de nitrito (NO_2^-) do sobrenadante do homogeneizado de pulmão dos animais vacinados e desafiados. Para a dosagem de nitrito, 100 µL de sobrenadante dos homogeneizados foram

distribuídos em placas de 96 poços e adicionado 100 µL do reagente de Greiss contendo uma parte da solução estoque de NEED a 0,1% (Sigma, St. Louis, MO) e uma parte da solução estoque de sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico (H₃PO₄). Para análise quantitativa das amostras, foi construída na mesma placa a curva padrão contendo concentrações de nitrito de sódio variando entre 200 a 3 µM. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, a D.O. foi obtida em leitor de microplacas com filtro de 540 nm (µQuant Bio-Tek Instruments Inc.).

3.15 – Histologia

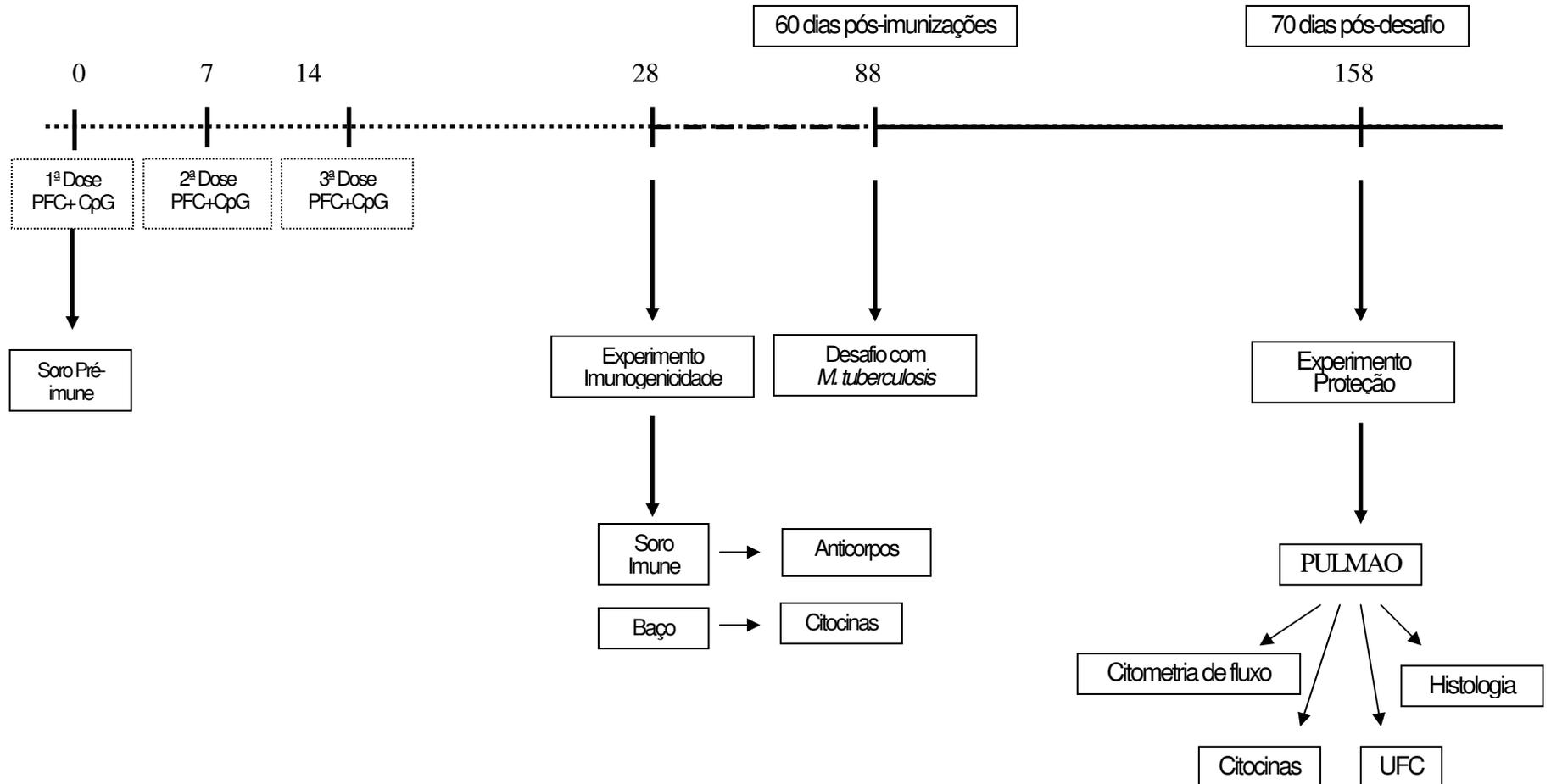
Para a análise histológica do pulmão dos animais desafiados, imunizados ou não, o lóbulo superior direito do pulmão de cada animal foi coletado e fixado em formol tamponado com fosfato. Posteriormente esse material foi processado pela técnica Ana Maria Rocha, no laboratório coordenado pelo Dr. Édson Garcia Soares, no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Foram realizados os cortes histológicos (5 µm) e as lâminas obtidas foram coradas com Hematoxilina e Eosina. Também foi realizada uma coloração por Ziehl Nielsen, específica para Bacilos Álcool Ácido Resistentes (BAAR) para a detecção de *M. tuberculosis*. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica pelo patologista Dr. Édson Garcia Soares.

3.16 - Análise estatística

Para realização da análise estatística utilizou-se o programa Prism 4.0. Foi feita a análise de variância (ANOVA) seguida do teste t não-pareado para comparar os dados entre os diferentes grupos experimentais. Foram considerados significativos os valores com $p < 0,05$.

3.17- Delineamento experimental

Dias:



Resultados

4. RESULTADOS

4.1 - Análise das proteínas presentes no filtrado de cultura de *M. tuberculosis*

Para avaliação das diversas frações de proteínas presentes no filtrado de cultura de *M. tuberculosis* (PFC), realizou-se uma eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 1). Foram aplicadas no gel, além das amostras e do padrão de peso molecular, diferentes concentrações de BSA que permitiram a quantificação das frações por meio de comparação da densidade das bandas obtidas com a curva de BSA (Tabela 1).

Como se pode observar na figura 1 e na tabela 1, com a adição de 1 µg de PFC na canaleta (B), revelaram-se 3 bandas cada uma com peso molecular de aproximadamente 32-35 kDa (r11), 29-30 kDa (r12) e 9-10 kDa (r16), sendo esta última banda a de maior densidade. Na canaleta C, que continha 5 µg de PFC, além destas três bandas r11, r12 e r16, revelaram-se outras quatro, cada uma com cerca de 70 kDa (r5), 54-56 kDa (r7), 40-41 kDa (r9) e 6 kDa (r17). Na canaleta D, referente à aplicação de 10 µg de PFC, visualizou-se mais uma banda, correspondente a 47 a 50 kDa (r8). Quando foram aplicados 25 µg de PFC, visualizado no canaleta E, verificou-se que ocorreu apenas aumento da densidade das bandas, não havendo revelação de nenhuma banda adicional. Sendo assim, com essa concentração de antígeno PFC, pôde-se observar a presença de frações protéicas com pesos moleculares entre 70 e 6 kDa.

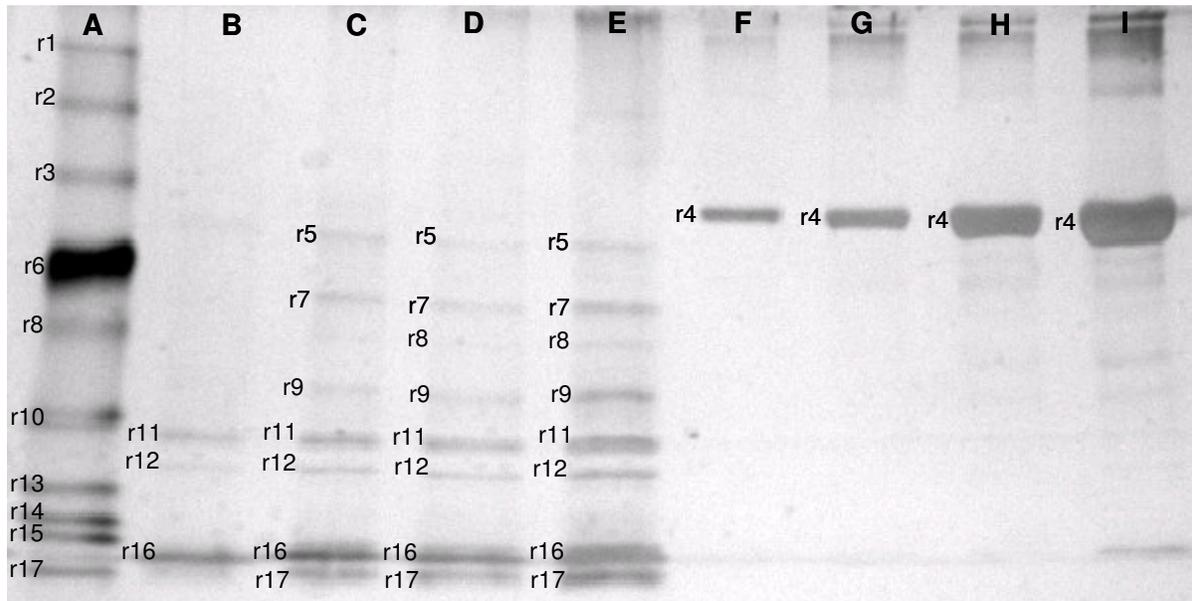


Figura 1: Perfil eletroforético da suspensão de PFC. Diferentes concentrações de PFC foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), corado com nitrato de prata. Juntamente com as amostras, foi aplicado no gel um padrão de peso molecular de 6,7 a 179 kDa e uma curva de BSA de 1 a 10 µg. Canaleta A: padrão de peso molecular, B: 1 µg de PFC, C: 5 µg de PFC, D: 10 µg de PFC, E: 25 µg de PFC; F: 1 µg de BSA, G: 2 µg de BSA, H: 5 µg de BSA, I: 10 µg de BSA. As diversas bandas marcadas correspondem aos pesos moleculares descritos na tabela 1.

Bandas	A Padrão		B PFC 1µg		C PFC 5µg		D PFC 10µg		E PFC 25µg		F BSA 1		G BSA2		H BSA5		I BSA10	
	PM	[µg]	PM	[µg]	PM	[µg]	PM	[µg]	PM	[µg]	PM	[µg]	PM	[µg]	PM	[µg]	PM	[µg]
r1	179,300	0,063																
r2	120,000	0,279																
r3	83,800	1,018																
r4											75,550	1,677	74,257	2,423	75,117	4,790	75,987	8,362
r5					70,102	1,553	68,902	2,013	68,902	0,980								
r6	65,800	30,024																
r7					56,446	0,846	54,092	0,711	54,555	0,876								
r8	50,100	3,408					47,727	0,610	47,727	0,642								
r9					41,263	0,820	41,013	1,094	41,013	1,823								
r10	38,600	3,936																
r11			35,377	0,463	34,364	1,093	33,704	0,903	34,364	1,600								
r12			30,005	0,143	30,005	0,642	29,146	0,460	29,430	1,091								
r13	27,500	2,578																
r14	20,500	3,012																
r15	16,100	2,845																
r16			9,832	2,605	9,832	3,128	9,308	2,826	9,308	3,892								
r17	6,700	1,548			6,343	1,172	6,005	1,151	5,684	2,099								
Total		48,712		3,211		9,253		9,769		13,002		1,677		2,423		4,790		8,362

Tabela 1: Perfil eletroforético da suspensão de PFC. Diferentes concentrações de PFC (1, 5, 10 ou 25 µg, B, C, D e E respectivamente) foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Juntamente com as amostras, foi aplicado no gel um padrão de peso molecular (A) e uma curva de BSA (F, G, H e I). Os resultados da tabela correspondem ao peso molecular das bandas presentes nas amostras e a concentração de proteína presente em cada banda. PM = peso molecular da banda e [µg] = concentração protéica na banda (em µg).

4.2 - Padronização das imunizações com o antígeno PFC e o adjuvante CpG

Após a identificação das frações protéicas presentes na suspensão de PFC, foi realizada uma padronização do esquema de imunização dos animais. Para isto, camundongos BALB/c foram imunizados com diferentes doses do antígeno PFC e dos motivos CpG, o que permitiu a definição das concentrações de antígeno e adjuvante a serem utilizados nas imunizações subseqüentes. Com base em dados da literatura (ANDERSEN *et al.*, 1994; HUBBARD *et al.*, 1992; ROBERTS *et al.*, 1995; LINDBLAD *et al.*, 1997), grupos de 3 animais receberam 3 imunizações por via subcutânea, com intervalos semanais, com as seguintes concentrações de PFC e CpG 1826: 25 µg de PFC + 30 µg de CpG 1826; 50 µg de PFC + 30 µg de CpG 1826; 100 µg de PFC + 30 µg de CpG 1826; 50 µg de PFC + 50 µg de CpG 1826. Como controle, um grupo de animais foi injetado com PBS.

Duas semanas após a última imunização, os animais foram sacrificados e realizou-se a coleta dos soros para a dosagem de anticorpos anti-PFC e do baço para estimulação *in vitro* com o antígeno específico.

4.2.1 – Detecção de anticorpos anti-PFC

Em relação à produção de anticorpos IgG1 e IgG2a (Figura 2) anti-PFC, os diferentes protocolos de imunização com PFC e adjuvantes empregados possibilitaram a detecção níveis aumentados de anticorpos anti-PFC das duas subclasses em relação aos soros pré-ímmunes e aos do grupo controle (animais injetados com PBS). Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos imunizados com as diferentes concentrações de PFC. Além disso, a sensibilização das placas com 5 ou 2,5 µg/mL de PFC (dados não mostrados), também não resultou em diferenças relevantes nos dados obtidos.

Apesar de não ter havido diferença estatística entre os grupos imunizados, os animais vacinados com 50 µg de PFC + 50 µg de CpG 1826 e com 100 µg de PFC + 30 µg de CpG 1826 apresentaram níveis aparentemente mais altos de anticorpos IgG2a anti-PFC.

Os mesmos animais imunizados com 50 µg de PFC + 50 µg de CpG 1826 apresentaram menor produção de anticorpos IgG1 anti-PFC, enquanto as demais imunizações estimularam principalmente a produção de IgG1 antígeno-específica.

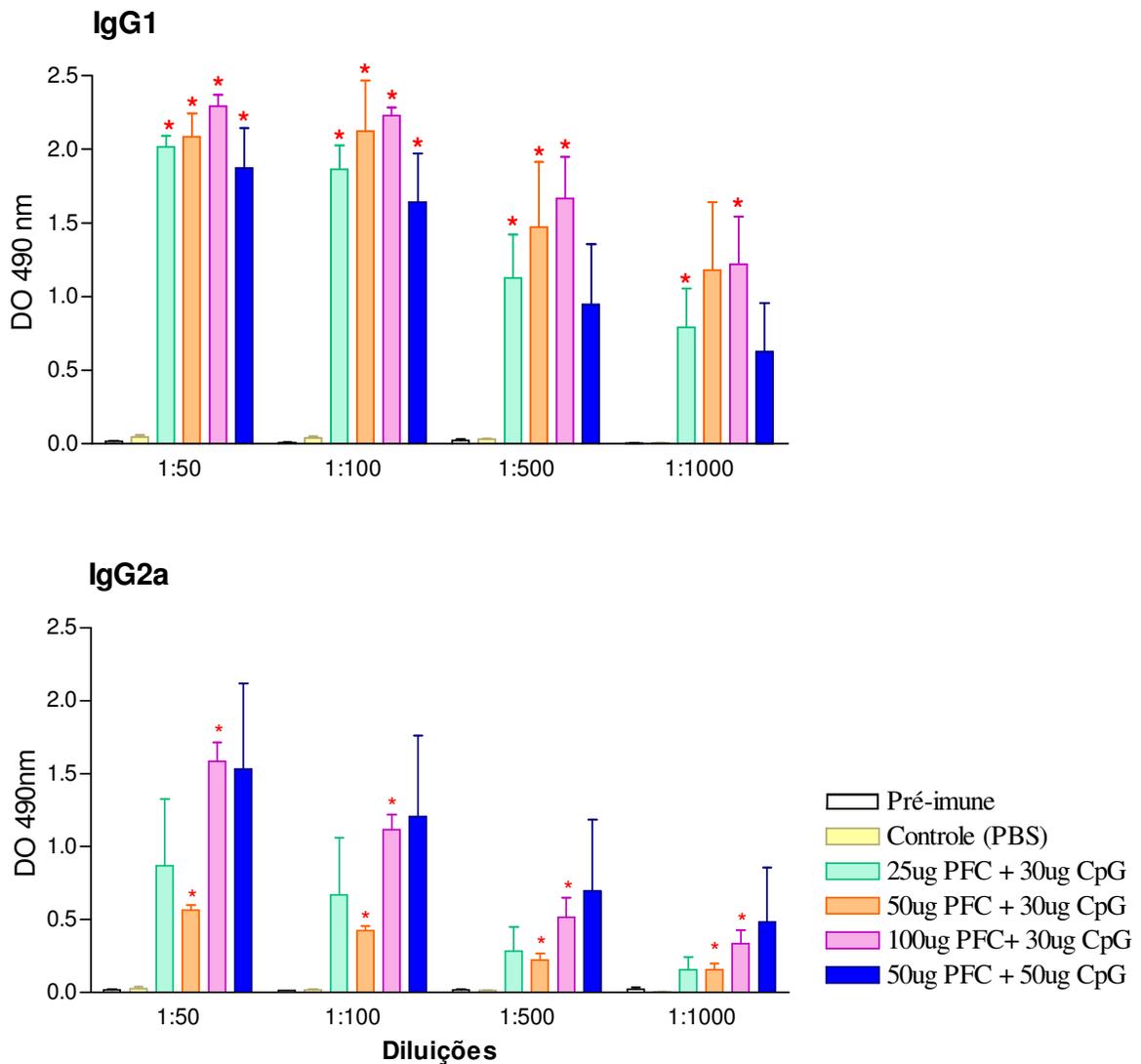


Figura 2: Detecção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-PFC no soro de animais imunizados com diferentes concentrações de PFC e CpG 1826. Camundongos BALB/c receberam três imunizações por via subcutânea com intervalos de 7 dias. Os diferentes grupos (n=3) receberam 25, 50 ou 100 µg do antígeno PFC acrescido de 30 µg de CpG 1826 ou 50 µg de PFC acrescido de 50 µg de CpG 1826. Os animais do grupo controle receberam PBS. Os níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-PFC foram detectados por ELISA nos soros dos animais (diluídos 50, 100, 500 e 1000 vezes) antes do início das imunizações (pré-imune) e duas semanas após a última imunização. O ensaio de ELISA foi realizado com sensibilização da placa com 2,5 µg/mL de PFC em tampão de ligação. Os resultados são representados pela média \pm desvio padrão da densidade óptica (DO) das amostras de cada grupo (n=3). * $p < 0,05$ em relação aos grupos pré-imune e controle (PBS).

4.2.2 Detecção de citocinas em sobrenadantes de cultura de células do baço

Quinze dias após a última imunização, as células do baço dos animais foram cultivadas mediante diferentes concentrações do estímulo específico, 10, 5 ou 2,5 µg/mL de PFC, ou do estímulo policlonal, 40 ou 4 µg/mL de concanavalina A (ConA). Quarenta e oito horas após o estímulo, os sobrenadantes foram coletados para dosagem das citocinas IFN-γ, IL-2, IL-4 e IL-10.

A comparação dos níveis de IFN-γ detectados nos diferentes grupos experimentais não mostrou diferença estatisticamente significativa. Contudo, a imunização com 50 µg de PFC + 50 µg de CpG 1826 induziu níveis mais elevados dessa citocina, em relação aos demais grupos, quando as células foram estimuladas com 10 e 2,5 µg/mL de PFC. Quando o estímulo foi de 5 µg/mL de PFC, o grupo que recebeu 50 µg de PFC + 30 µg de CpG 1826 apresentou produção maior que os demais grupos. Além disso, os grupos experimentais que receberam 50 µg de PFC + 30 µg de CpG 1826, 100 µg de PFC + 30 µg de CpG 1826 e 50 µg de PFC + 50 µg de CpG 1826 apresentaram níveis de IFN-γ mais elevados em relação ao grupo controle (injetado com PBS) quando as células foram estimuladas com as diferentes concentrações do antígeno-específico. O estímulo policlonal com 40 µg de ConA induziu produção significativa de IFN-γ em relação ao estímulo específico (Figura 3).

Um único animal do grupo que recebeu 50 µg de PFC + 30 µg de CpG 1826 apresentou nível detectável de IL-4, embora baixo, mediante estímulo específico, enquanto nenhum dos outros grupos apresentou produção desta citocina. Apenas o estímulo com 40 µg/mL de ConA induziu níveis significativos em todos os grupos em relação ao estímulo específico PFC (dados não mostrados).

Em relação à produção de IL-2, verificamos que células do baço de animais imunizados com diferentes concentrações de PFC e CpG secretaram níveis significativos de IL-2 frente re-estimulação antígeno-específica em relação às células não estimuladas *in vitro*. Células do baço de animais que receberam PBS (grupo controle) apresentaram

produção espontânea de IL-2 similar à produção frente à estimulação antígeno-específica. A estimulação policlonal com 40 µg/mL de ConA induziu níveis significativamente mais altos de IL-2 em relação ao estímulo com 4 µg/mL de ConA e em relação ao estímulo específico em todos os grupos experimentais (Figura 4).

A estimulação das culturas com PFC resultou em produção significativa de IL-10 em relação às células não estimuladas de todos os grupos experimentais. Contudo, os níveis foram mais elevados nos grupos de animais imunizados com PFC e CpG em relação ao grupo controle. Não houve diferença estatística quando comparamos os diferentes grupos mediante o estímulo com PFC. Além disso, a estimulação policlonal com 40 µg/mL de ConA induziu níveis significativamente mais altos de IL-10 em relação ao estímulo com 4 µg/mL de ConA e ao estímulo específico com PFC em todos os grupos experimentais (Figura 4).

De acordo com os resultados apresentados nas figuras 2, 3 e 4, foi definida como concentração a ser utilizada nos protocolos de imunização: 50 µg de antígeno PFC acrescidas de 50 µg do adjuvante CpG 1826. Esta concentração foi a que melhor estimulou produção de anticorpos IgG2a antígeno-específicos e IFN- γ , embora também tenha estimulado produção de IL-10.

Além disso, a concentração de 10 µg/mL de PFC para estimulação antígeno-específica *in vitro* mostrou-se mais eficiente na indução da produção das citocinas analisadas (Figuras 3 e 4), sendo portanto, definida para estimular as culturas.

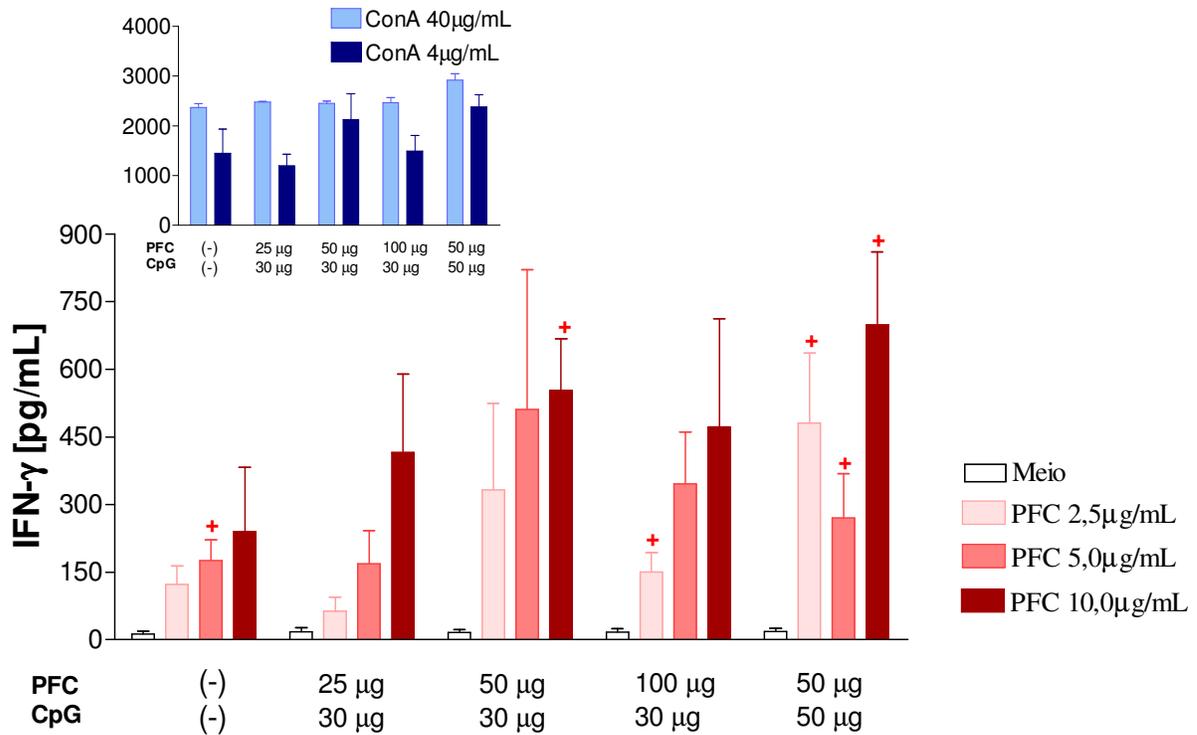


Figura 3: Detecção de IFN- γ e IL-4 em sobrenadantes de células do baço de animais imunizados com diferentes concentrações de PFC e CpG 1826. Camundongos BALB/c receberam três imunizações com intervalos de 7 dias. Os diferentes grupos (n=3) receberam 25 (A), 50 (B) ou 100 μ g (C) do antígeno PFC acrescido de 30 μ g de CpG 1826 ou 50 μ g de PFC acrescido de 50 μ g de CpG 1826 (D). Os animais do grupo controle receberam PBS (CT). Duas semanas após a última imunização, os animais foram sacrificados e as células do baço foram estimuladas com concanavalina A (conA) 4 μ g/mL ou 40 μ g/mL, ou PFC 2,5 μ g/mL, 5 μ g/mL ou 10 μ g/mL. Após 48 horas, os sobrenadantes foram coletados para detecção de citocinas por ELISA. + p<0,05 em relação ao sobrenadante de cultura de células não estimuladas (meio)

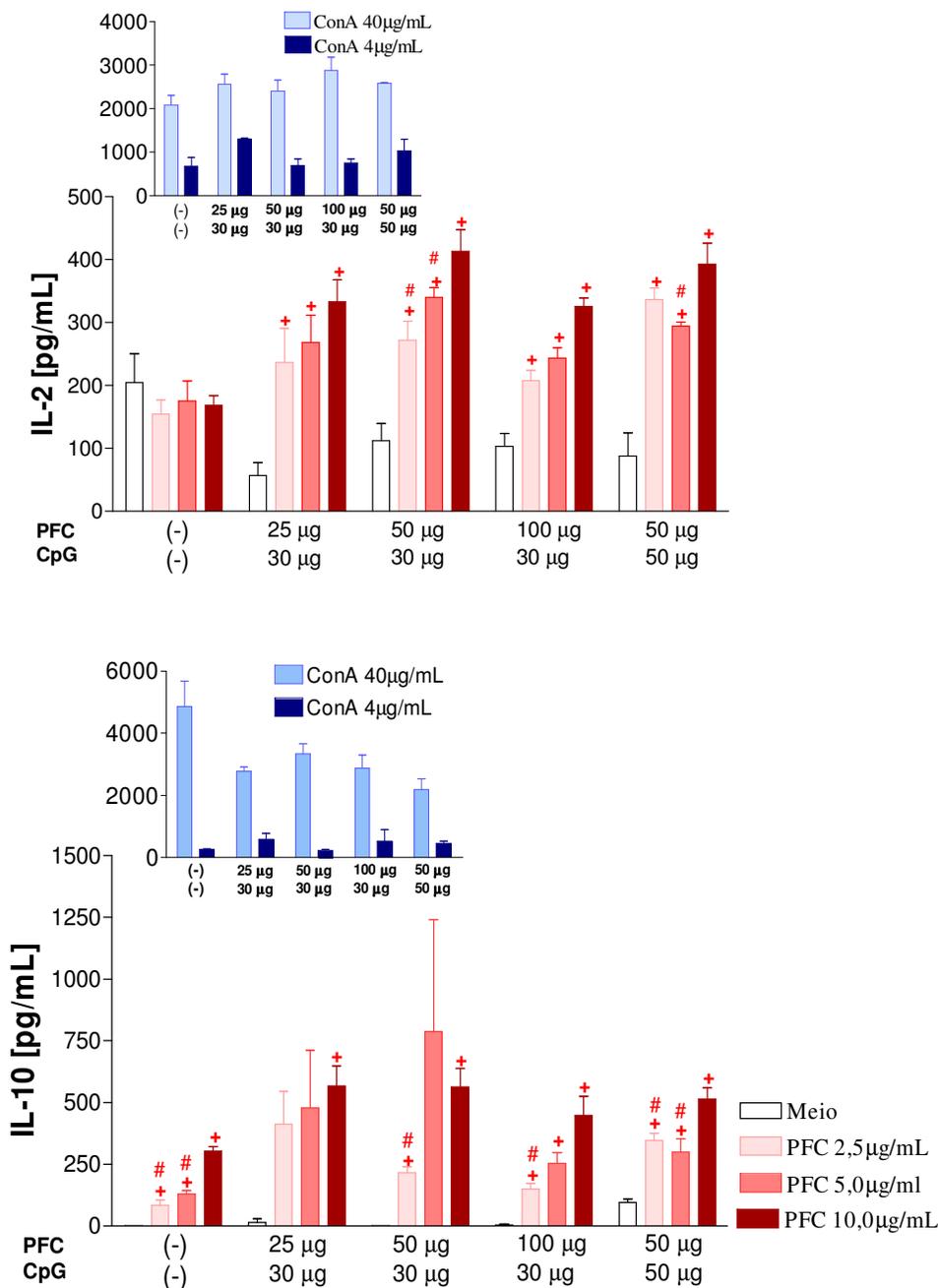


Figura 4: Detecção de IL-2 e IL-10 em sobrenadantes de células do baço de animais imunizados com diferentes concentrações de PFC e CpG 1826. Camundongos BALB/c receberam três imunizações com intervalos de 7 dias. Os diferentes grupos (n=3) receberam 25 (A), 50 (B) ou 100 µg (C) do antígeno PFC acrescido de 30 µg de CpG 1826 ou 50 µg de PFC acrescido de 50 µg de CpG 1826 (D). Os animais do grupo controle receberam PBS (CT). Duas semanas após a última imunização, os animais foram sacrificados e as células do baço foram estimuladas com concanavalina A (conA) 4 µg/mL ou 40 µg/mL, ou PFC 2,5 µg/mL, 5 µg/mL ou 10 µg/mL. Após 48 horas, os sobrenadantes foram coletados para detecção de citocinas por ELISA. + p<0,05 em relação ao sobrenadante de cultura de células não estimuladas (meio), # p<0,05 em relação ao sobrenadante de células estimuladas com 10 µg/mL de PFC.

4.3 - Avaliação da indução de resposta imune humoral e celular após imunização de camundongos Balb/c

Padronizadas as concentrações de antígeno e adjuvante a serem utilizadas, grupos de 5 camundongos BALB/c foram imunizados com 50 µg de PFC acrescidas de 50 µg de CpG 1826 (imunoestimulatório) ou de 50 µg de CpG 2041 (controle); 50 µg de PFC em Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) por via subcutânea, em 3 doses com intervalos de 7 dias. Os animais do grupo controle receberam 100 µL de PBS pela mesma via.

Duas semanas após a última imunização, os animais foram sacrificados, realizou-se a coleta do soro para dosagem de anticorpos anti-PFC e do baço para detecção de citocinas produzidas após estimulação *in vitro* com antígeno específico.

4.3.1 – Detecção de anticorpos anti-PFC

Os resultados da dosagem de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-PFC encontram-se expressos na figura 5.

Os níveis de anticorpos IgG1 anti-PFC apresentaram-se significativamente elevados nos grupos imunizados com PFC e os diferentes adjuvantes (CpG 1826 e AIF) ou com CpG 2041 (não estimulatório) em relação aos grupos controle (PBS) e aos soros pré-ímmunes. Os animais imunizados com PFC emulsificado em AIF mostraram níveis significativamente mais altos em relação aos demais grupos. Esses animais apresentaram níveis baixos de anticorpos IgG2a enquanto aqueles imunizados com o antígeno PFC acrescido de CpG 1826 apresentaram níveis significativamente mais altos de anticorpos IgG2a anti-PFC. Em nenhum dos outros grupos detectou-se a presença significativa de anticorpos IgG2a.

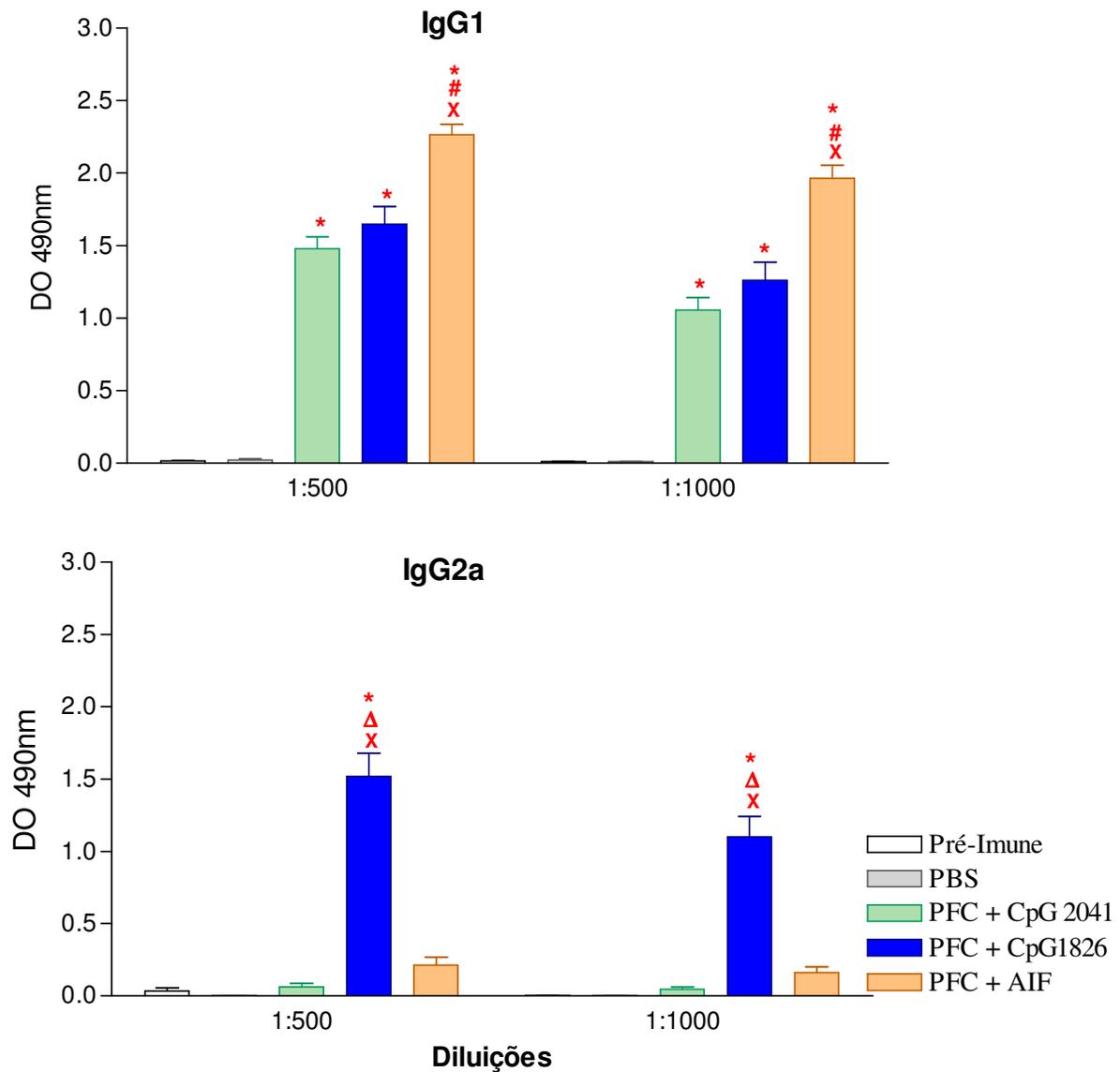


Figura 5: Detecção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-PFC. Camundongos BALB/c foram imunizados por via subcutânea com 50 µg do antígeno PFC acrescido de 50 µg de CpG 1826, 50 µg de CpG 2041 ou em Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) em 3 doses com intervalos de 7 dias. O grupo controle recebeu PBS nas imunizações. Os níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-PFC foram detectados por ELISA no soro dos animais (diluído 500 e 1000 vezes) antes do início das imunizações (pré-imune) e duas semanas após a última imunização. Os resultados são representados pela média ± desvio padrão da densidade óptica das amostras de cada grupo (n=5). * p<0,01 em relação aos grupos pré-imune e controle, # p<0,05 em relação ao grupo imunizado com PFC + CpG 1826; Δ p<0,05 em relação ao grupo imunizado com PFC + AIF; x p<0,01 em relação ao grupo imunizado com PFC + CpG 2041.

4.3.2 Detecção de citocinas em sobrenadante de cultura de células do baço

Após a avaliação da produção de anticorpos, detectamos o perfil de citocinas produzidas mediante estimulação específica. Analisamos a ativação celular por meio da detecção de citocinas que regulam a resposta imune, como IFN- γ , IL-5, IL-12 e IL-10.

Com relação à produção de IL-12, apresentada na figura 6, verificamos que não houve diferença estatística entre os grupos de animais imunizados. No entanto, células do baço de animais vacinados com PFC e CpG 1826 secretaram níveis mais elevados, porém não significativos, de IL-12 em relação aos demais grupos. Observamos também que os níveis de IL-12 detectados no grupo controle foram elevados e semelhantes aos níveis detectados nos grupos de animais imunizados com PFC + CpG 2041 ou PFC emulsificado com AIF.

Em relação à produção de IL-10, verificamos que células de animais imunizados com PFC em AIF produziram concentrações estatisticamente elevadas desta citocina em relação aos demais grupos (Figura 6). Assim como o que ocorreu com a produção de IL-12, a produção espontânea de IL-10, detectada nos sobrenadantes de células não estimuladas, foi elevada, principalmente no grupo controle e em animais imunizados PFC + CpG 1826.

Em síntese, a vacina PFC + CpG 1826 estimulou tanto a produção de IL-12 quanto de IL-10 por células do baço, embora as concentrações de IL-12 detectadas tenham sido superiores às de IL-10. Do contrário, a imunização com PFC + AIF estimulou altos níveis de IL-10 e níveis mais baixos de IL-12. Diante desses resultados, fomos avaliar a produção de IFN- γ e de IL-5 nos sobrenadantes de cultura de células do baço dos diferentes grupos experimentais.

A indução de resposta imune celular específica foi avaliada pela produção de IFN- γ após estímulo específico com PFC (Figura 7). Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais. Contudo, entre os animais imunizados com PFC, os grupos que receberam AIF e CpG 1826 produziram níveis mais elevados de IFN- γ frente estimulação específica em relação ao grupo controle o grupo de animais que receberam PFC + CpG 2041.

Quanto à produção de IL-5, também apresentada na figura 7, constatou-se que animais imunizados com PFC em AIF produziram níveis significativos desta citocina em relação aos demais grupos, enquanto os grupos que receberam CpG 2041 e CpG 1826 produziram concentrações mais baixas, ainda assim, significativas em relação ao controle. Apesar de não haver diferença estatística, os animais imunizados com PFC + CpG 1826 produziram níveis inferiores de IL-5 em relação aos imunizados com PFC + CpG 2041.

Portanto, a imunização com a vacina experimental PFC + CpG 1826 estimulou a produção antígeno-específica de IFN- γ , IL-12 e IL-10, baixa produção de IL-5 e altos níveis de anticorpos específicos IgG2a. A imunização com PFC em AIF desencadeou a produção de elevados e significativos níveis de IgG1, IFN- γ , IL-5 e IL-10. Por outro lado, o uso de CpG controle (CpG 2041), similar a imunização apenas com o antígeno sem adjuvante, induziu apenas a produção significativa de anticorpos IgG1 e de IL-5 e IL-10.

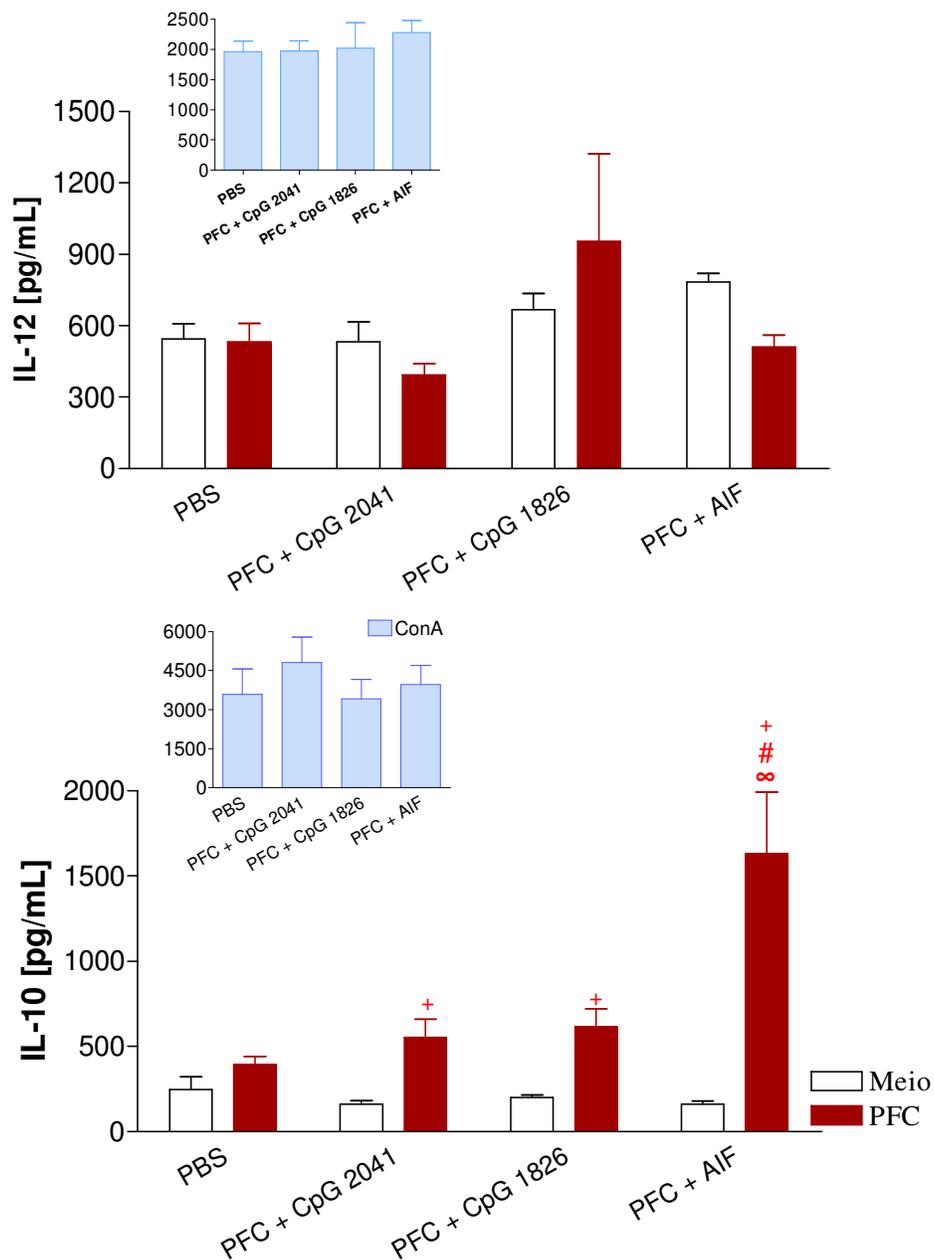


Figura 6: Detecção de IL-12 e IL-10 em sobrenadantes de células do baço de animais imunizados. Camundongos BALB/c (n=5) foram imunizados por via subcutânea com 50 µg do antígeno PFC acrescido de 50 µg de CpG 1826, PFC acrescido de 50 µg de CpG 2041 ou em AIF em 3 doses com intervalos de 7 dias. O grupo controle recebeu PBS. Duas semanas após a última imunização, os animais foram sacrificados e as células do baço foram estimuladas com 40 µg/mL de concanavalina A (conA) ou com 10 µg/mL de PFC. Após 48 horas, os sobrenadantes das culturas foram coletados para detecção de citocinas por ELISA. Os resultados são expressos em média ± desvio padrão da concentração da citocina em pg/mL. ∞ p<0,01 em relação aos demais grupos, # p<0,05 em relação às células do mesmo grupo estimuladas com PFC; + p<0,05 em relação ao sobrenadante de cultura de células não estimuladas (meio).

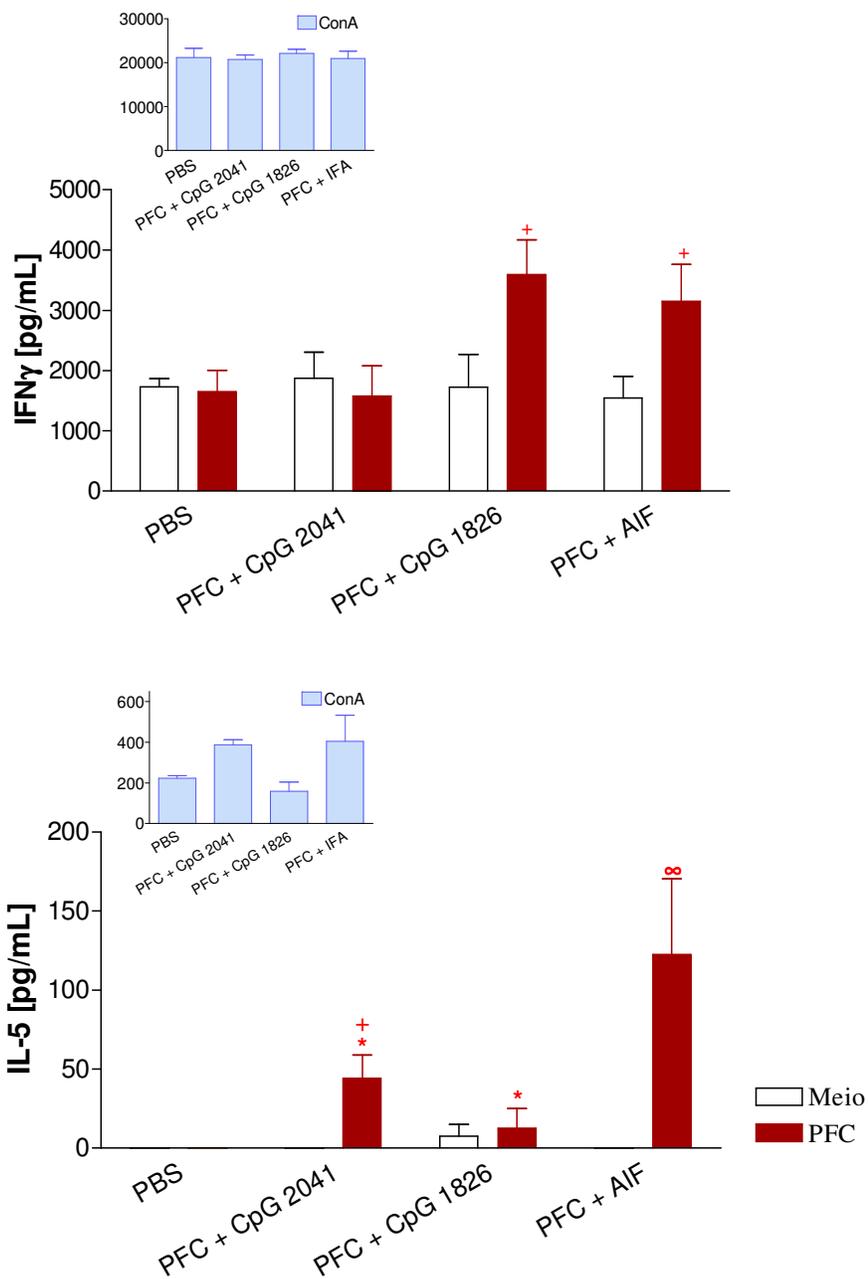


Figura 7: Detecção de IFN γ e IL-5 em sobrenadante de células do baço de animais imunizados. Camundongos BALB/c (n=5) foram imunizados por via subcutânea com 50ug do antígeno PFC acrescido de 50ug de CpG 1826, PFC acrescido de 50ug de CpG 2041 ou em Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) em 3 doses com intervalos de 7 dias. O grupo controle recebeu PBS. Duas semanas após a última imunização, os animais foram sacrificados e as células do baço foram estimuladas com 40ug/mL de concanavalina A (conA) ou com 10 μ g/mL de PFC. Após 48 horas, os sobrenadantes das culturas foram coletados para detecção de citocinas por ELISA. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão da concentração da citocina em pg/mL. + p<0,05 em relação ao sobrenadante de cultura de células não estimuladas (meio). * p<0,05 em relação ao grupo não imunizado (PBS); ∞ p<0,05 em relação aos demais grupos.

4.4 - Ensaio de proteção para avaliação da eficácia da vacina experimental

Após a avaliação da imunogenicidade da vacina experimental, testamos a atividade protetora dessa preparação. Camundongos BALB/c foram imunizados com o antígeno PFC acrescido de CpG 1826, CpG 2041 ou antígeno emulsificado em AIF. Neste experimento adicionamos um grupo de animais que recebeu a vacina experimental (PFC + CpG 1826) pela via intranasal. Como controle, os animais receberam PBS pelas vias subcutânea ou intranasal. Dois meses após a última imunização, os animais foram desafiados por via intratraqueal com uma cepa virulenta de *M. tuberculosis*. Como controle do procedimento de infecção um grupo experimental recebeu PBS no desafio, esse grupo foi denominado de “grupo Branco”, para ser diferenciado do grupo controle infectado e não imunizado (grupo PBS). Setenta dias após o desafio, o pulmão dos animais foi avaliado quanto ao número de UFC de *M. tuberculosis*.

Como pode-se observar na figura 8, os animais imunizados com PFC + AIF apresentaram uma redução significativa, de $1,2 \log_{10}$, no número de UFC em relação ao grupo controle PBS (apenas infectado) e ao grupo de animais imunizados com PFC + CpG 2041. Os animais que receberam PFC + CpG 1826 pela via subcutânea apresentaram uma discreta, de $0,5 \log_{10}$, redução no número de UFC em relação a esses dois grupos, PBS e PFC + CpG 2041, contudo essa diferença não foi estatisticamente significativa. Além disso, os animais imunizados com PFC + CpG 1826 pela via intranasal apresentaram um aumento significativo no número de UFC em relação ao seu respectivo grupo controle, que recebeu PBS por via intranasal nas imunizações. Portanto, a imunização com a vacina experimental, PFC + CpG 1826 não conferiu proteção significativa contra infecção por *M. tuberculosis*.

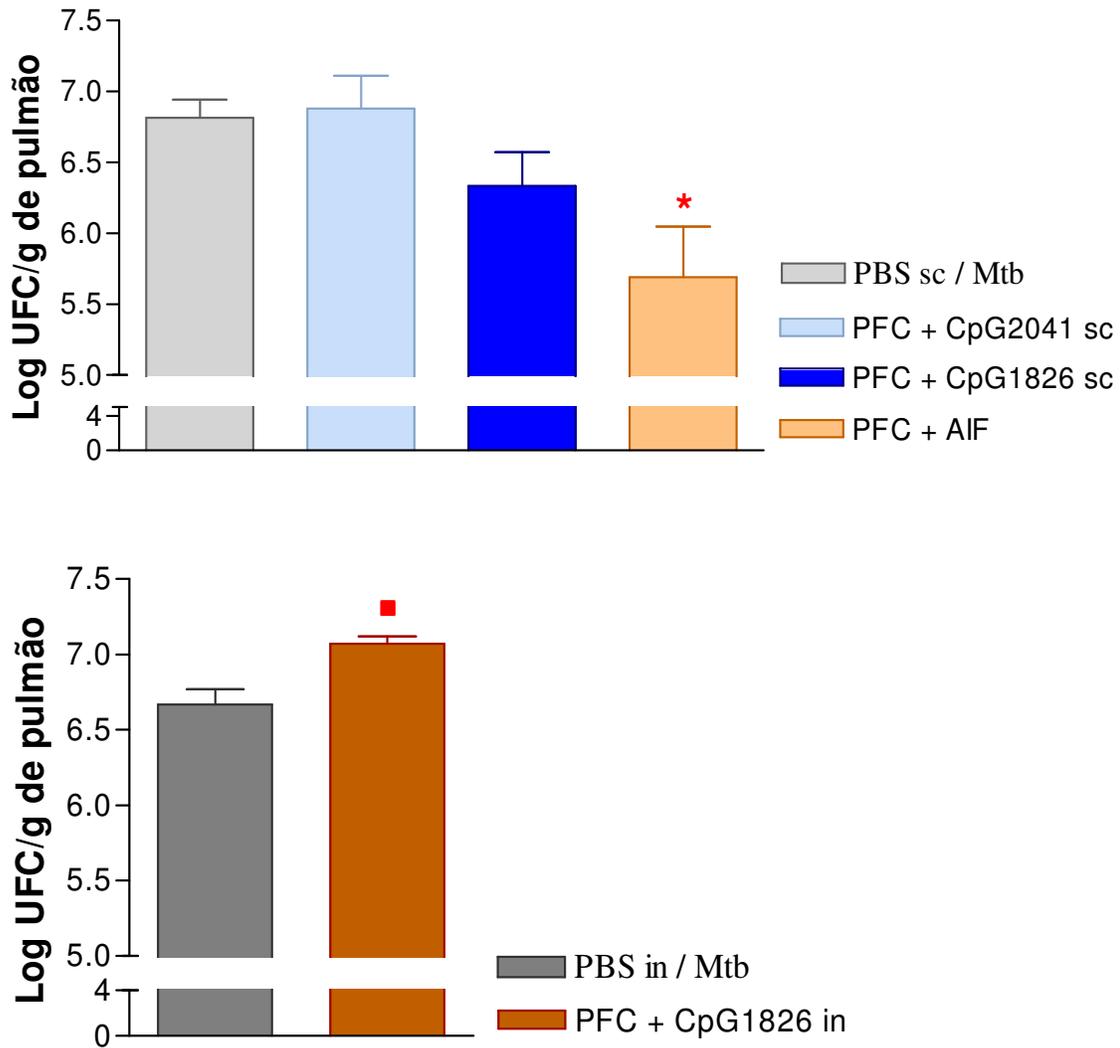


Figura 8: Número de unidades formadoras de colônia (UFC) no pulmão de animais imunizados ou não e infectados com *M. tuberculosis*. Camundongos BALB/c foram imunizados por via subcutânea (n=8) ou intranasal (n=6) com 50 µg do antígeno PFC acrescido de 50 µg de CpG 1826, 50 µg de PFC acrescido de 50 µg de CpG 2041 (n=7) ou em AIF (n=7), em 3 doses com intervalos de 7 dias. O grupo controle recebeu PBS por via subcutânea (n=12) ou intranasal (n=8) – PBS/Mtb. Sessenta dias após última imunização, os animais foram desafiados com *M. tuberculosis* H37Rv, 1×10^5 bacilos por via intratraqueal. Setenta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e o pulmão coletado, digerido e as células plaqueadas em meio de cultura 7H11. Após 28 dias de cultura, o número de UFC foi analisado. Resultados expressos em Log_{10} do número de UFC por grama de pulmão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, que recebeu PBS pela via subcutânea; ■ $p < 0,05$ em relação ao grupo controle que recebeu PBS pela via intranasal (PBS in).

4.5 - Avaliação da resposta imune no pulmão dos animais desafiados

4.5.1 – Detecção de citocinas em homogenato de pulmão

O perfil de resposta imune induzido no local da infecção foi avaliado pela detecção das citocinas da imunidade adaptativa, IFN- γ e IL-5 (Figura 9); inflamatórias IL-12, IL-6 e TNF- α (Figura 10) e regulatórias, IL-10 e TGF- β (Figura 11).

Quando comparamos os resultados obtidos entre o grupo de animais não imunizados e os animais não infectados (Branco) com o grupo não imunizado e infectado (PBS), verificamos que houve um aumento significativo na produção de todas as citocinas dosadas, IL-12, IL-6, TNF- α , IL-10, TGF- β e IFN- γ , exceto para a produção de IL-5, que foi semelhante entre esses dois grupos. Além disso, os níveis de IFN- γ , IL-12, IL-6 e TNF- α foram mais elevados quando comparados aos níveis de IL-5, IL-10 e TGF- β nos pulmões dos animais infectados (Figuras 9, 10 e 11).

Animais imunizados com solução de PFC + CpG 1826 pela via subcutânea apresentaram maior produção de IFN- γ , embora não significativa, e produziram níveis similares de IL-10 e TGF- β em relação ao grupo apenas infectado (PBS). Além disso, ainda em relação ao grupo PBS, observamos que animais imunizados com PFC + CpG 1826 pela via subcutânea produziram menos IL-5, IL-12, IL-6 e TNF- α , sendo detectada redução significativa para a produção de IL-6 e TNF- α (Figuras 9, 10 e 11).

Verificamos a produção de concentrações similares de IL-12, TNF- α , IL-10 e TGF- β quando comparamos o grupo imunizado com PFC + CpG 1826 ao grupo imunizado com PFC + CpG 2041 (não estimulatório). Ainda com relação a estes dois grupos, observamos que animais imunizados com PFC + CpG 1826 produziram concentrações mais elevadas de IFN- γ e IL-5 e menores de IL-6. No entanto, estas diferenças foram significativas apenas para IL-5 e IL-6 (Figura 9, 10 e 11).

Os animais imunizados com PFC + CpG 1826 pela via intranasal apresentaram uma redução significativa nos níveis de IL-10 e um aumento na produção de IL-12 e IL-6 em relação ao seu respectivo grupo controle, que recebeu PBS pela via intranasal. Além disso,

a imunização com PFC + CpG 1826 pela via intranasal, em relação ao grupo que recebeu PFC + CpG 1826 pela via subcutânea, induziu a produção de níveis mais baixos de IFN- γ e IL-10, mais altos de IL-5, TGF- β , IL-12 e TNF- α e similares de IL-6. Entretanto, foi sendo estatisticamente significativa apenas a diferença para a produção de IL-12 e TNF- α (Figura 9, 10 e 11).

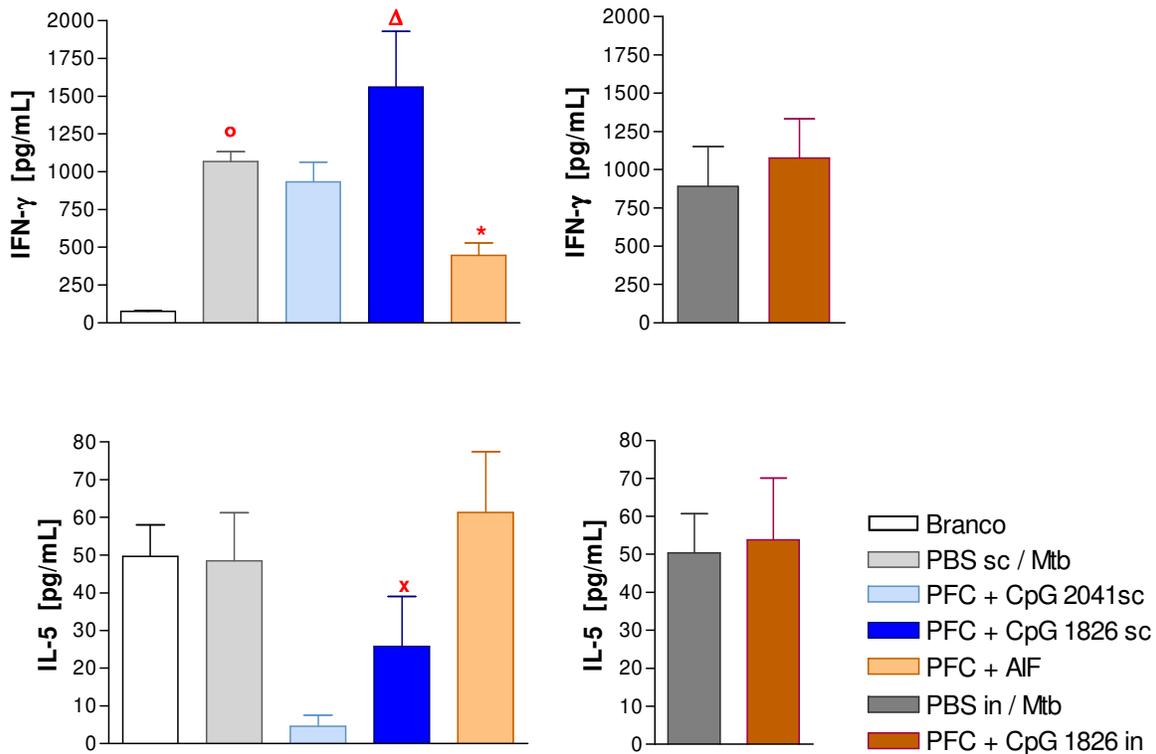


Figura 9: Detecção de citocinas em homogenatos de pulmão de animais imunizados e desafiados com *M. tuberculosis*. Camundongos BALB/c foram imunizados por via subcutânea (n=8) ou intranasal (n=6) com 50 µg do antígeno PFC acrescido de 50 µg de CpG 1826, 50 µg de PFC acrescido de 50 µg de CpG 2041 (n=7) ou em AIF (n=7), em 3 doses com intervalos de 7 dias. O grupo controle recebeu PBS por via subcutânea (n=12) ou intranasal (n=8) – PBS/Mtb. Sessenta dias após última imunização, os animais foram desafiados com *M. tuberculosis* H37Rv, 1×10^5 bacilos por via intratraqueal. Setenta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e o pulmão coletado e foram dosadas as citocinas no homogenato dos pulmões por ELISA. Os resultados expressam a média \pm desvio padrão da concentração de citocina em pg/mL. O $p < 0,05$ em relação ao grupo não infectado (Branco); * $p < 0,05$ em relação ao grupo infectado, não imunizado (PBS); x $p < 0,05$ em relação ao grupo imunizado com PFC + CpG 2041; Δ $p < 0,05$ em relação ao grupo imunizado com PFC + AIF

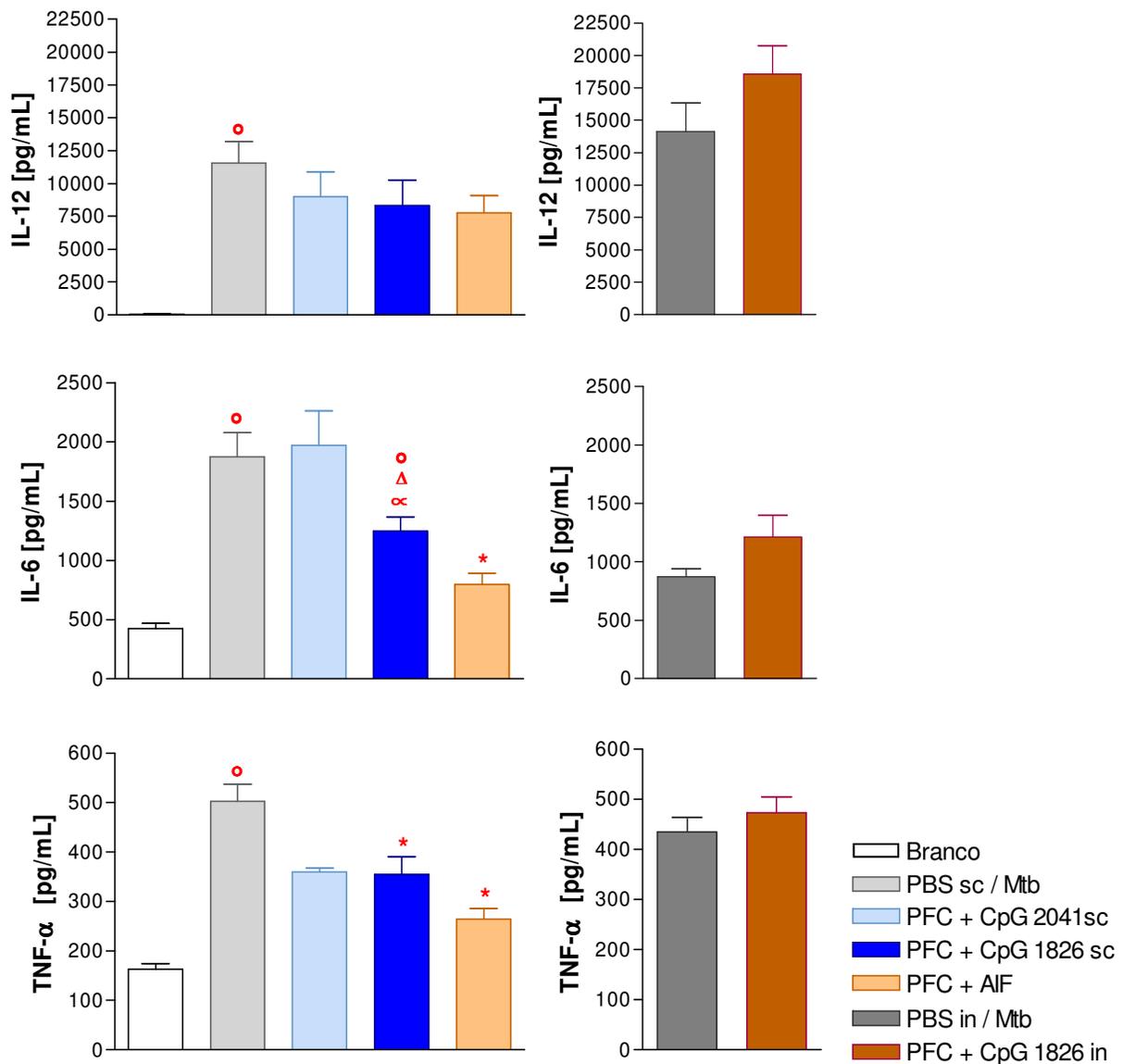


Figura 10: Detecção de citocinas em homogenatos de pulmão de animais imunizados e desafiados com *M. tuberculosis*. Camundongos BALB/c foram imunizados por via subcutânea (n=8) ou intranasal (n=6) com 50 µg do antígeno PFC acrescido de 50 µg de CpG 1826, 50 µg de PFC acrescido de 50 µg de CpG 2041 (n=7) ou em AIF (n=7), em 3 doses com intervalos de 7 dias. O grupo controle recebeu PBS por via subcutânea (n=12) ou intranasal (n=8). Sessenta dias após última imunização, os animais foram desafiados com *M. tuberculosis* H37Rv, 1×10^5 bacilos por via intratraqueal. Setenta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e o pulmão coletado e foram dosadas as citocinas no homogenato dos pulmões por ELISA. Os resultados expressam a média \pm desvio padrão da concentração de citocina em pg/mL. O $p < 0,05$ em relação ao grupo não infectado (Branco); * $p < 0,05$ em relação ao grupo infectado, não imunizado (PBS); ∞ $p < 0,05$ em relação ao grupo não imunizado e desafiado (PBS) e ao grupo imunizado com PFC + CpG 2041; Δ $p < 0,05$ em relação ao grupo imunizado com PFC + AIF.

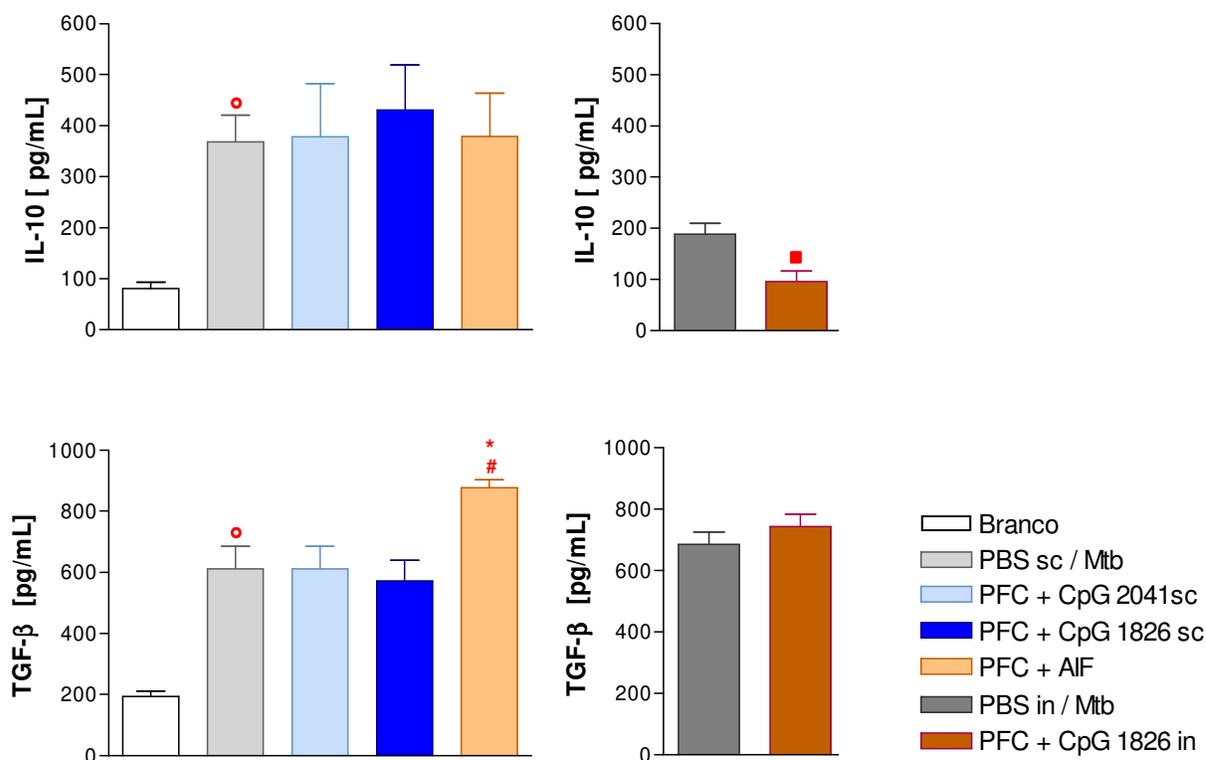


Figura 11: Detecção de citocinas em homogenatos de pulmão de animais imunizados e desafiados com *M. tuberculosis*. Camundongos BALB/c foram imunizados por via subcutânea (n=8) ou intranasal (n=6) com 50 µg do antígeno PFC acrescido de 50 µg de CpG 1826, 50 µg de PFC acrescido de 50 µg de CpG 2041 (n=7) ou em AIF (n=7), em 3 doses com intervalos de 7 dias. O grupo controle recebeu PBS por via subcutânea (n=12) ou intranasal (n=8). Sessenta dias após última imunização, os animais foram desafiados com *M. tuberculosis* H37Rv, 1×10^5 bacilos por via intratraqueal. Setenta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e o pulmão coletado e foram dosadas as citocinas no homogenato dos pulmões por ELISA. Os resultados expressam a média \pm desvio padrão da concentração de citocina em pg/mL. O $p < 0,05$ em relação ao grupo não infectado (Branco); * $p < 0,05$ em relação ao grupo infectado, não imunizado (PBS); # $p < 0,05$ em relação ao grupo imunizado com PFC + CpG 1826 pela via subcutânea; ■ $p < 0,05$ em relação aos grupo infectado que recebeu PBS pela via intranasal (PBS in)

4.5.2 – Detecção de óxido nítrico em homogenato de pulmão

De acordo com a figura 12, os grupos de animais desafiados, imunizados ou não, apresentaram um aumento significativo dos níveis de óxido nítrico (NO) em relação aos animais não infectados (grupo Branco).

Animais imunizados com PFC + CpG 1826 pela via subcutânea ou PFC + CpG 2041 apresentaram um aumento na produção de nitrito em relação aos animais não imunizados e infectados (PBS), embora esse aumento não tenha sido significativo. O grupo imunizado com PFC em AIF produziu níveis similares de nitrito quando comparado ao grupo não imunizado e infectado.

Além disso, os animais imunizados com PFC + CpG 1826 pela via intranasal apresentaram níveis inferiores, não significativos, de nitrito em relação ao seu respectivo grupo controle, animais desafiados que receberam PBS pela via intranasal (PBS in)

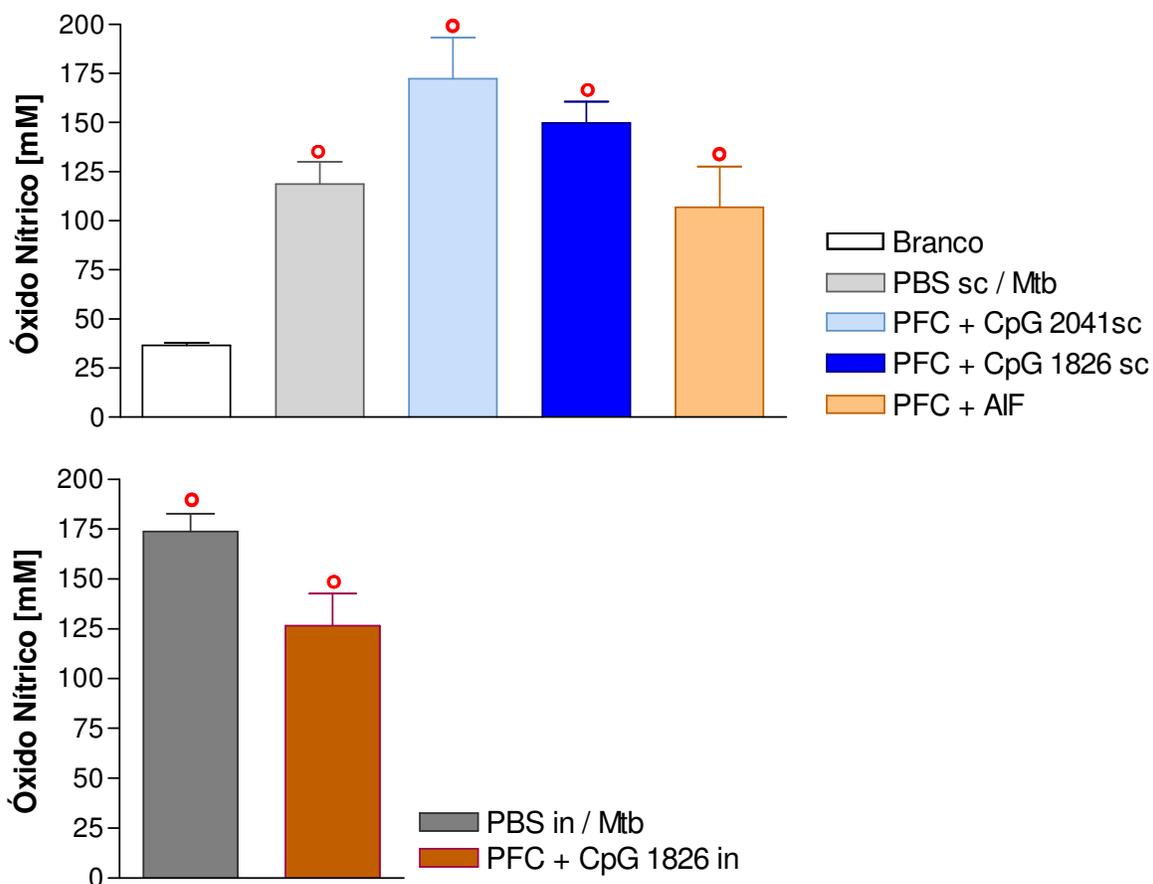


Figura 12: Detecção de Óxido Nítrico em homogenato de pulmão de animais imunizados e desafiados com *M. tuberculosis*. Camundongos BALB/c foram imunizados por via subcutânea (n=8) ou intranasal (n=6) com 50 µg do antígeno PFC acrescido de 50 µg de CpG 1826, 50 µg de PFC acrescido de 50 µg de CpG 2041 (n=7) ou em AIF (n=7), em 3 doses com intervalos de 7 dias. O grupo controle recebeu PBS por via subcutânea (n=12) ou intranasal (n=8) – PBS/Mtb. Sessenta dias após última imunização, os animais foram desafiados com *M. tuberculosis* H37Rv, 1x10⁵ bacilos por via intratraqueal. Setenta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e o pulmão coletado e dosou-se a produção de óxido nítrico no homogenato dos pulmões. Os resultados expressam a média ± desvio padrão da concentração de citocina em pg/mL. ○ p<0,05 em relação ao grupo não infectado (Branco).

4.5.3 – Análise do fenótipo celular em pulmão de camundongos BALB/c após o desafio

Inicialmente, determinamos o número de células T (CD3+) e B (CD19+) presentes na população de linfócitos das amostras de células de pulmão provenientes de camundongos BALB/c imunizados, 70 dias pós-desafio.

Como podemos observar na figura 13, todos os grupos de animais desafiados, previamente imunizados ou não, apresentaram aumento significativo do influxo de linfócitos T e B, caracterizado pelo aumento no número de células CD3+ e CD19+ respectivamente, em relação aos linfócitos presentes no pulmão de animais do grupo Branco (não infectado). Constatamos também que houve um maior influxo de linfócitos T em relação aos linfócitos B.

Quando observamos os dados obtidos referentes aos grupos não imunizados e infectados (PBS sc e PBS in) ou que foram imunizados e desafiados, verificamos que animais imunizados com PFC + AIF, PFC + CpG 2041 e com PFC + CpG 1826 apresentaram número de células CD3+ inferior, mas não significativo, em relação aos grupos não imunizados e infectados (Figura 13).

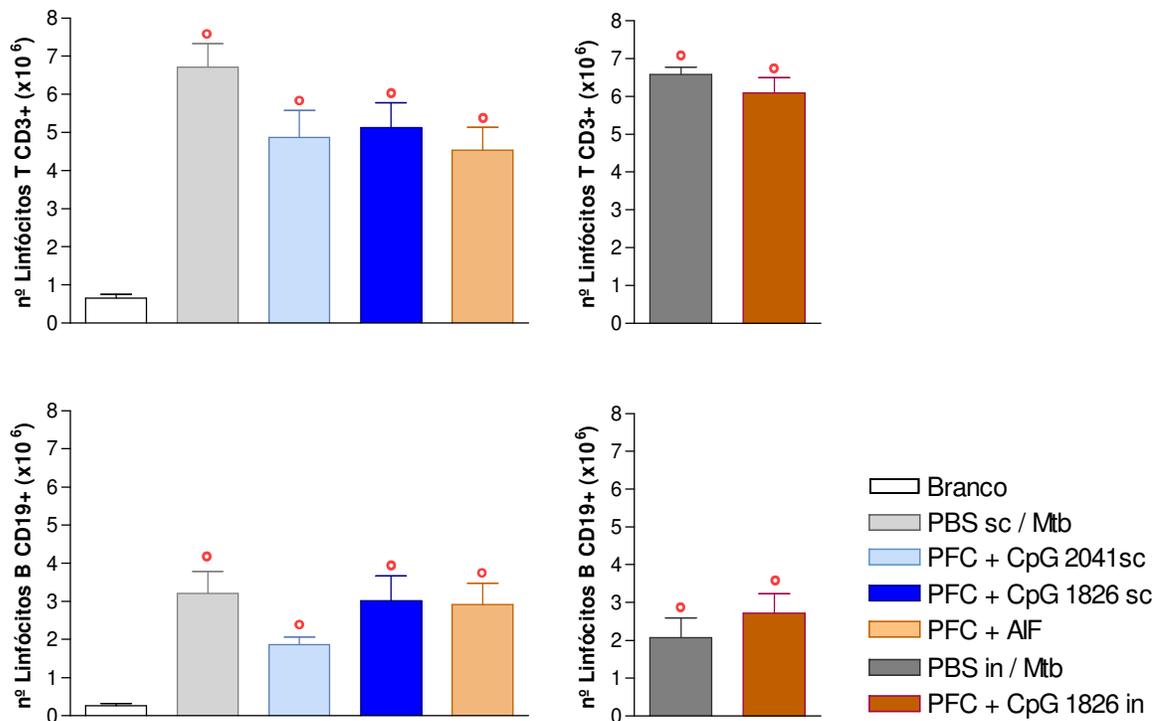


Figura 13: Número de linfócitos T (CD3+) e B (CD19+) presentes no pulmão. Camundongos BALB/c foram imunizados por via subcutânea (n=8) ou intranasal (n=6) com 50 µg do antígeno PFC acrescido de 50 µg de CpG 1826, 50 µg de PFC acrescido de 50 µg de CpG 2041 (n=7) ou em AIF (n=7), em 3 doses com intervalos de 7 dias. O grupo controle recebeu PBS por via subcutânea (n=12) ou intranasal (n=8) – PBS/Mtb. Sessenta dias após última imunização, os animais foram desafiados com *M. tuberculosis* H37Rv, 1x10⁵ bacilos por via intratraqueal. Setenta dias após o desafio, os animais foram sacrificados, e foram analisadas as populações de linfócitos T e B no pulmão. ○ p<0,05 em relação ao grupo não infectado (Branco).

As figuras 14, 15 e 16 mostram o número de linfócitos T CD4+, CD8+ e de linfócitos B (CD19+) e a expressão de CD18, marcador de ativação e migração celular, e de CD44^{hi}, marcador de células efetoras e de memória, nessas populações de linfócitos, respectivamente.

Quando comparamos o grupo de animais não imunizados e não infectados (Branco) com aqueles não imunizados e infectados (PBS), observamos um aumento significativo no número de linfócitos CD4+ neste último grupo. Ainda em relação a estes dois grupos, verificamos também que os animais infectados apresentaram aumento significativo na expressão de CD18, caracterizada pelo aumento da mediana da intensidade de fluorescência, e da expressão de CD44^{hi} em linfócitos T CD4+ (Figuras 15 e 16).

Animais não imunizados e infectados apresentaram aumento no número de linfócitos T CD4+ e aumento da expressão de CD18 nessa população de células em relação aos grupos de animais infectados que foram imunizados com PFC + AIF, PFC + CpG 2041 e PFC + CpG 1826 pela via subcutânea. Esse aumento foi estatisticamente significativo apenas para os grupos imunizados com PFC + CpG 2041 e PFC + AIF (Figuras 14 e 15). A expressão de CD44^{hi} nos linfócitos T CD4+ foi semelhante em todos os grupos desafiados, independentemente do protocolo de imunização (Figura 16).

Na figura 14 podemos observar que o número de células CD8+ no pulmão dos animais infectados, imunizados ou não, foi significativamente superior ao número detectado nos pulmões dos animais não imunizados e não infectados (Branco). Constatamos também um aumento significativo na expressão de CD18 e na expressão de CD44^{hi} nos linfócitos T CD8+ dos animais desafiados em relação aos não desafiados, Branco (Figuras 15 e 16).

Comparando-se as diferentes imunizações, verificamos que houve uma redução significativa no número de células T CD8+ nos grupos imunizados com PFC + AIF em relação grupo não imunizado e infectado (Figura 14). Com relação à expressão de CD18, verificamos um aumento significativo da MIF (Mediana da Intensidade de Fluorescência) para CD18 no grupo imunizado com PFC + CpG 1826 pela via intranasal em relação ao grupo não imunizado e infectado (Figura 15). Grupos de animais imunizados com PFC +

CpG 1826, PFC + CpG 2041 e PFC + AIF apresentaram menor expressão de CD18 nas células CD8+ em relação aos animais não imunizados e infectados (PBS), embora essa diferença não tenha sido significativa (Figura 15). Quando avaliamos a expressão de CD44^{hi} em linfócitos T CD8+ não constatamos diferenças entre os grupos infectados, imunizados ou não (Figura 16).

A expressão de CD18 e de CD44^{hi} nas células B CD19+ foi similar entre os diferentes grupos experimentais estudados (Figuras 15 e 16) É válido ressaltar que a expressão de CD18 nos linfócitos CD19+ foi bem inferior à expressão deste mesmo receptor nas populações de linfócitos CD4+ e CD8+ (Figura 15).

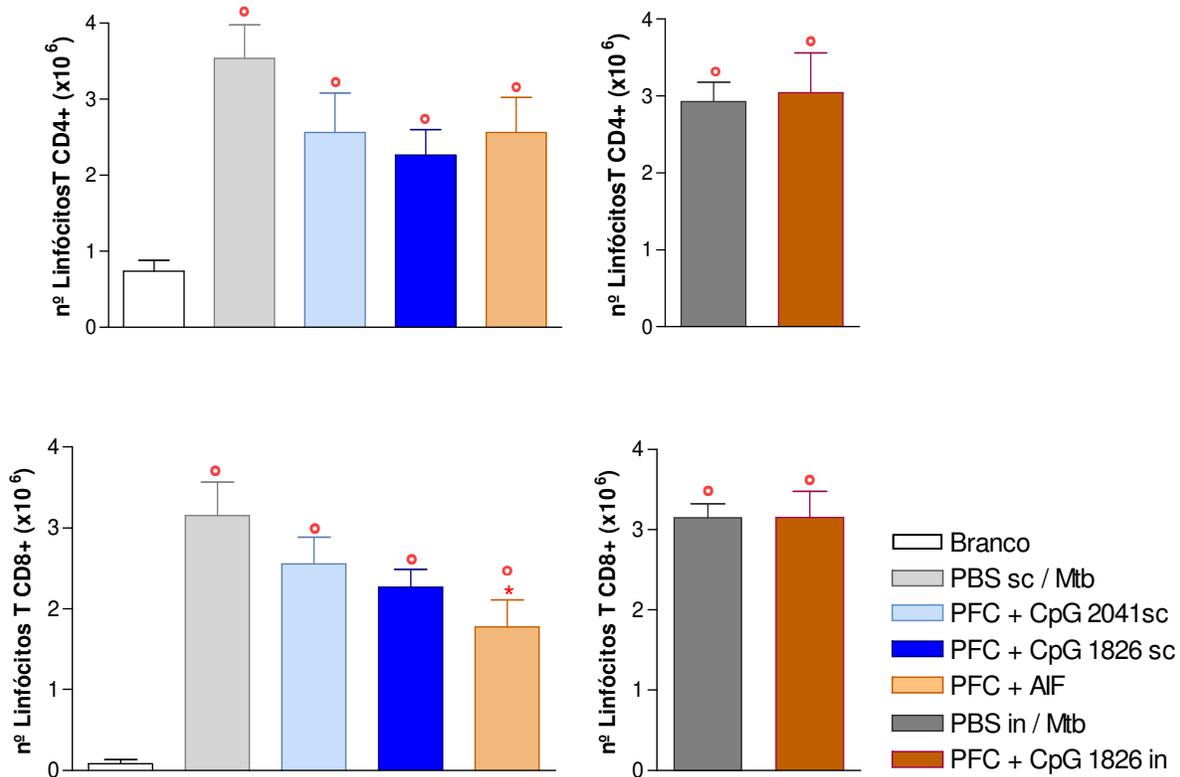


Figura 14: Número de linfócitos T CD4+ e T CD8+ presentes no pulmão. Camundongos BALB/c foram imunizados por via subcutânea (n=8) ou intranasal (n=6) com 50 µg do antígeno PFC acrescido de 50 µg de CpG 1826, 50 µg de PFC acrescido de 50 µg de CpG 2041 (n=7) ou em AIF (n=7), em 3 doses com intervalos de 7 dias. O grupo controle recebeu PBS por via subcutânea (n=12) ou intranasal (n=8) – PBS - Mtb. Sessenta dias após última imunização, os animais foram desafiados com *M. tuberculosis* H37Rv, 1x10⁵ bacilos por via intratraqueal. Setenta dias após o desafio, os animais foram sacrificados, e foram analisadas as populações de linfócitos T e B no pulmão. O p<0,05 em relação ao grupo não infectado (Branco); * p< 0,05 em relação ao grupo infectado, não imunizado (PBS).

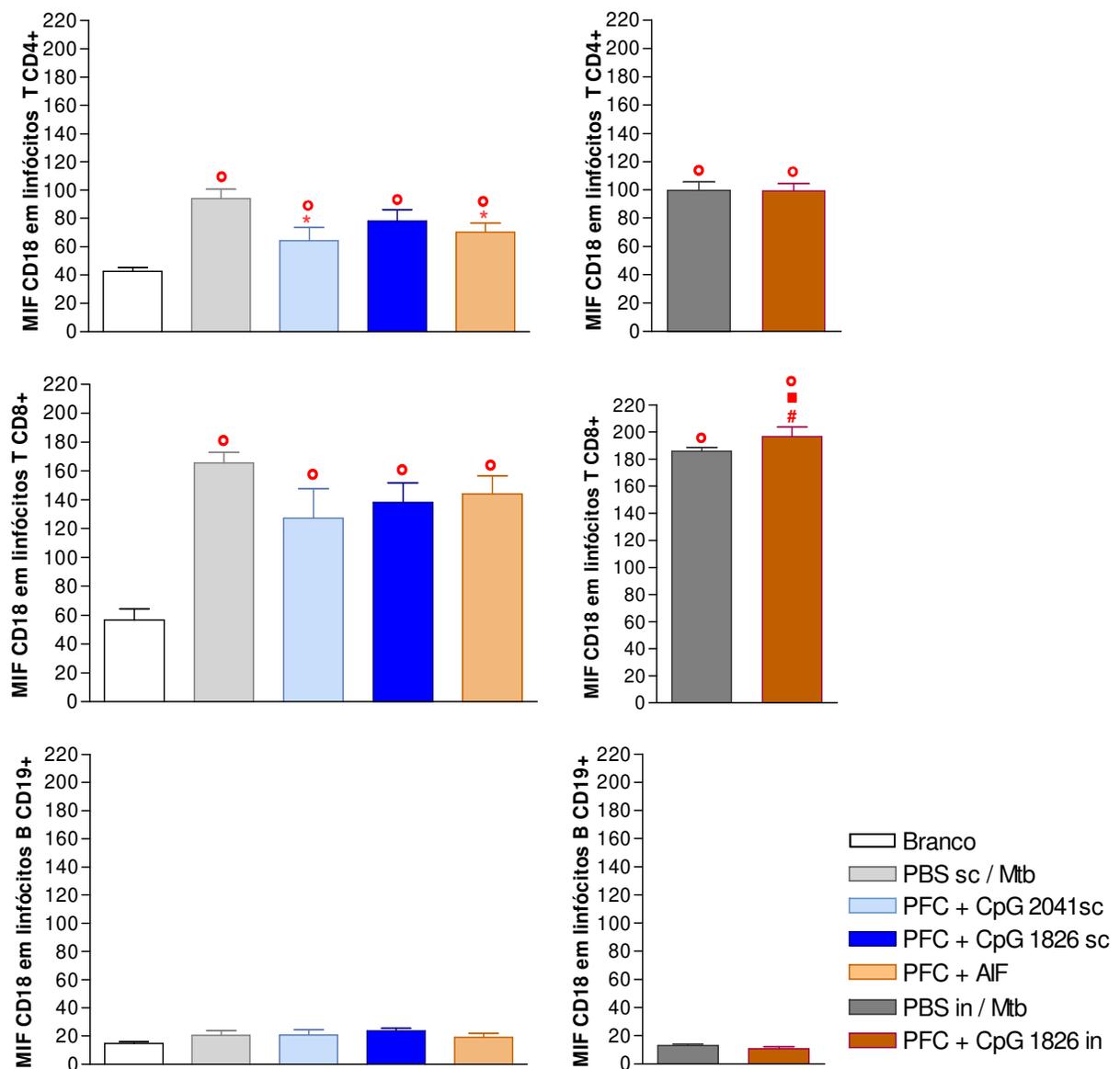


Figura 15: Análise do fenótipo de ativação de linfócitos CD4+, CD8+ e CD19+ por meio da expressão da molécula CD18. Camundongos BALB/c foram imunizados por via subcutânea (n=8) ou intranasal (n=6) com 50 µg do antígeno PFC acrescido de 50 µg de CpG 1826, 50 µg de PFC acrescido de 50 µg de CpG 2041 (n=7) ou em AIF (n=7), em 3 doses com intervalos de 7 dias. O grupo controle recebeu PBS por via subcutânea (n=12) ou intranasal (n=8) – PBS/Mtb. Sessenta dias após a última imunização, os animais foram desafiados com *M. tuberculosis* H37Rv, 1×10^5 bacilos por via intratraqueal, como controle, o grupo Branco recebeu PBS e não *M. tuberculosis*. Setenta dias após o desafio, os animais foram sacrificados, e analisou-se expressão de CD18 em linfócitos CD4+, CD8+ e CD19+ de pulmão. ○ p<0,05 em relação ao grupo não infectado (Branco); * p< 0,05 em relação ao grupo infectado, não imunizado (PBS); ■ p<0,05 em relação ao grupo infectado, que recebeu PBS pela via intranasal (PBS in); # p<0,05 em relação ao grupo imunizado com PFC + CpG 1826 pela via subcutânea

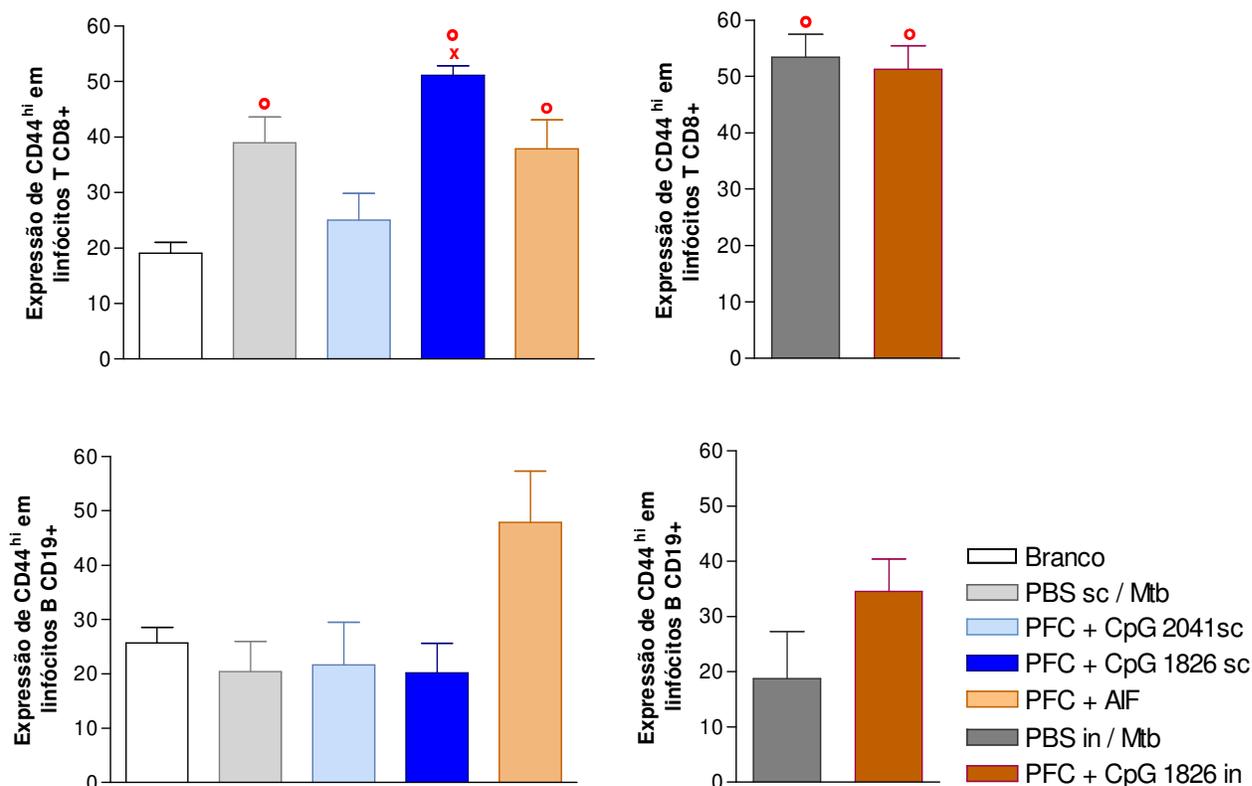


Figura 16: Análise do fenótipo de ativação de linfócitos CD4+, CD8+ e CD19+ por meio da expressão da molécula CD44^{hi}. Camundongos BALB/c foram imunizados por via subcutânea (n=8) ou intranasal (n=6) com 50 µg do antígeno PFC acrescido de 50 µg de CpG 1826, 50 µg de PFC acrescido de 50 µg de CpG 2041 (n=7) ou em AIF (n=7), em 3 doses com intervalos de 7 dias. O grupo controle recebeu PBS por via subcutânea (n=12) ou intranasal (n=8) – PBS/Mtb. Sessenta dias após a última imunização, os animais foram desafiados com *M. tuberculosis* H37Rv, 1x10⁵ bacilos por via intratraqueal, como controle, o grupo Branco recebeu PBS e não *M. tuberculosis*. Setenta dias após o desafio, os animais foram sacrificados, e analisou-se expressão de CD44^{hi} em linfócitos CD4+, CD8+ e CD19+ de pulmão. O p<0,05 em relação ao grupo não infectado (Branco); x p<0,05 em relação ao grupo imunizado com PFC + CpG 2041

Após a caracterização das populações de linfócitos presentes no pulmão, analisamos as populações de macrófagos (células CD11b+) e células dendríticas (células CD11c+), que foram inicialmente selecionadas de acordo com os parâmetros de tamanho e granulosidade. Nessas populações avaliou-se a expressão da molécula coestimulatória CD86 e da molécula de Classe II do MHC (IA^d) (Figuras 17 e 18).

Os resultados apresentados na figura 17A mostram um aumento significativo no número de células CD11b+ nos pulmões dos animais infectados, imunizados ou não, em relação aos animais não infectados. Quando comparamos os diversos grupos imunizados com o grupo controle (não imunizado e infectado), constatamos uma redução no número de células CD11b+ nos grupos de animais imunizados com PFC + AIF, PFC + CpG 2041 e PFC + CpG 1826 pela via subcutânea, que foi significativa para o grupo que recebeu PFC + CpG 1826.

A expressão da molécula de classe II do MHC e da molécula coestimulatória CD86 foi avaliada na população de células CD11b+, tanto através da porcentagem de células positivas para a molécula de classe II do MHC ou para CD86, quanto através da MIF (Mediana da Intensidade de Fluorescência). O resultado expresso na forma da porcentagem de células positivas para um determinado receptor nos fornece a informação sobre o número, a quantidade de células expressando o determinado receptor no local avaliado. Adicionalmente, a MIF nos fornece uma estimativa da densidade de um receptor expresso na superfície celular.

Com relação à expressão da molécula de classe II, tanto no que se refere à porcentagem quanto à MIF, verificamos que houve um aumento significativo na expressão de moléculas de classe II (IA^d) nas populações de células CD11b+ obtidas dos pulmões de animais infectados, imunizados ou não, em relação aos animais não imunizados e não infectados (Branco), como mostra a figuras 17 B e 17 C. No entanto, quando comparamos os diversos grupos imunizados com relação ao grupo controle (não imunizado e infectado), não constatamos diferenças significativas.

Quando avaliamos a expressão da molécula CD86 na população de células CD11b+, constatamos que houve um aumento na expressão da molécula CD86 nas células do pulmão dos animais infectados e não imunizados (grupo PBS) em relação aos animais não infectados (Branco) (figuras 17 D e 17 E). Também observamos que em relação ao grupo controle, apenas infectado, as diferentes imunizações pela via subcutânea, PFC + CpG 1826, PFC + CpG 2041 e PFC + AIF, não induziram alteração na expressão de CD86, tanto em relação à MIF quanto à porcentagem. Por outro lado, nos grupos que receberam PBS ou PFC + CpG 1826, ambos pela via intranasal, houve uma redução significativa na MIF e na porcentagem de células de pulmão expressando CD86 em relação aos animais infectados, que receberam PBS pela via subcutânea nas imunizações (figuras 17 D e 17 E).

Na figura 18 A podemos observar que o número de células dendríticas CD11c+ no grupo de animais infectados, imunizados ou não, foi significativamente maior em relação aos animais não infectados (Branco). Não observamos diferenças significativas no número de células CD11c+ quando comparamos os grupos que receberam as diferentes imunizações em relação ao grupo infectado não imunizado. Também observamos que o número de células CD11b+ é maior em relação ao número de células CD11c+ no pulmão dos animais infectados (figuras 17 A e 18 A).

A expressão da molécula de classe II do MHC e da molécula coestimulatória CD86 também foi avaliada na população de células CD11c+ utilizando os mesmos parâmetros descritos anteriormente para as células CD11b+. Verificamos que houve um aumento na expressão de moléculas de classe II do MHC, tanto para MIF quanto para porcentagem, no grupo de animais infectados, não imunizados (PBS), em relação ao grupo não infectado (Branco). Esse aumento foi estatisticamente significativo para a MIF (Figuras 18 B e 18 C). Quando comparamos a expressão da molécula de classe II do MHC nas células do pulmão dos animais que receberam as diferentes imunizações em relação ao grupo infectado não imunizado, constatamos que houve um aumento não significativo MIF dessa molécula no grupo imunizado com PFC + CpG 1826 pela via subcutânea (Figuras 18 B e 18 C).

Com relação à expressão da molécula CD86 na população de células CD11c+, verificamos que houve um aumento significativo tanto na MIF, quanto na MIF quanto na porcentagem de células CD86+ no grupo de animais infectados e não imunizados em relação ao grupo não infectado (Branco) (Figuras 18 D e 18 E). Quando compramos a expressão de CD86 em células CD11c+ provenientes de pulmão dos grupos de animais imunizados com o grupo infectado e não imunizado, observamos que as diferentes imunizações não induziram alteração na expressão dessa molécula (Figuras 18 D e 18 E). Além disso, da mesma forma como ocorreu com as células CD11b, houve uma redução na expressão de CD86 nos grupos que receberam PBS e PFC + CpG 1826, ambos pela via intranasal, em relação ao grupo infectado que recebeu PBS pela via subcutânea (Figuras 18 D e 18 E).

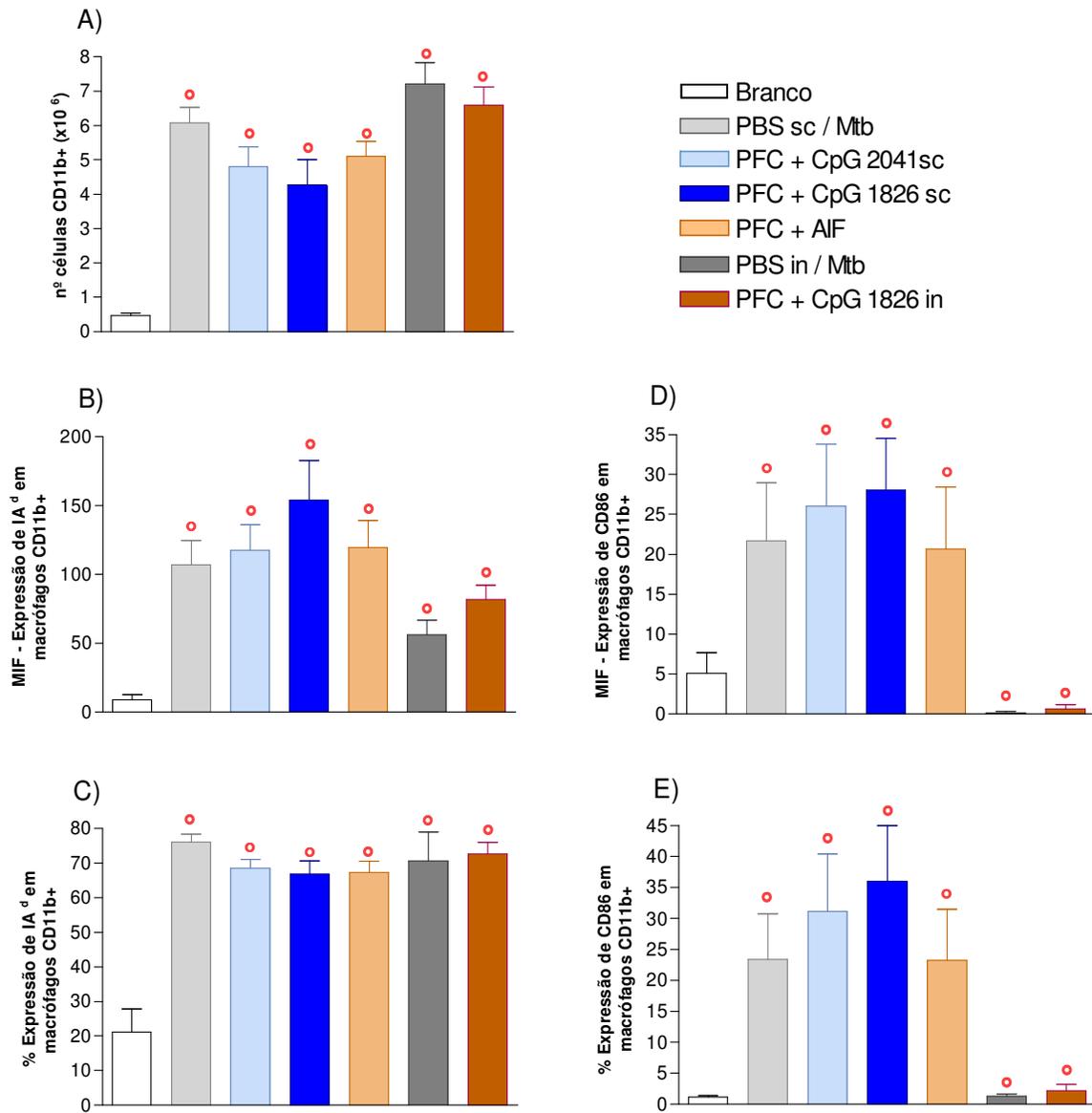


Figura 17: Análise do fenótipo de ativação de macrófagos por meio da expressão das moléculas CD86 e IA^d. Camundongos BALB/c foram imunizados por via subcutânea (n=8) ou intranasal (n=6) com 50 µg do antígeno PFC acrescido de 50 µg de CpG 1826, 50 µg de PFC acrescido de 50 µg de CpG 2041 (n=7) ou em AIF (n=7), em 3 doses com intervalos de 7 dias. O grupo controle recebeu PBS por via subcutânea (n=12) ou intranasal (n=8). Sessenta dias após a última imunização, os animais foram desafiados com *M. tuberculosis* H37Rv, 1x10⁵ bacilos por via intratraqueal, como controle, o grupo Branco recebeu PBS e não *M. tuberculosis*. Setenta dias após o desafio, os animais foram sacrificados, e analisou-se expressão de CD86 e da molécula de MHC de classe II (IA^d) na superfície de macrófagos (CD11b+) de pulmão. O p<0,05 em relação ao grupo não infectado (Branco)

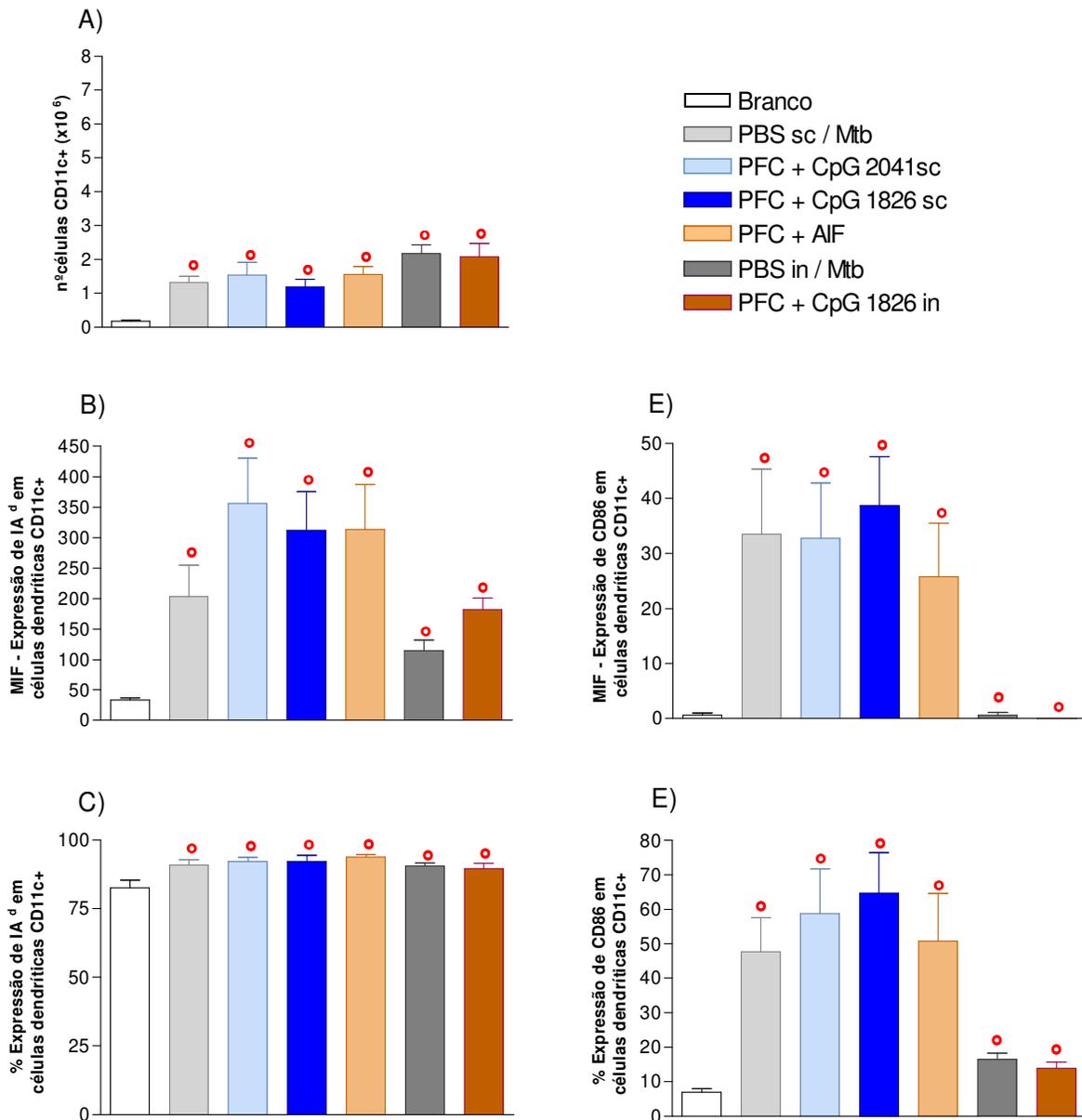


Figura 18: Análise do fenótipo de ativação de células dendríticas por meio da expressão das moléculas CD86 e IA^d. Camundongos BALB/c foram imunizados por via subcutânea (n=8) ou intranasal (n=6) com 50 µg do antígeno PFC acrescido de 50 µg de CpG 1826, 50 µg de PFC acrescido de 50 µg de CpG 2041 (n=7) ou em AIF (n=7), em 3 doses com intervalos de 7 dias. O grupo controle recebeu PBS por via subcutânea (n=12) ou intranasal (n=8). Sessenta dias após a última imunização, os animais foram desafiados com *M. tuberculosis* H37Rv, 1x10⁵ bacilos por via intratraqueal, como controle, o grupo Branco recebeu PBS e não *M. tuberculosis*. Setenta dias após o desafio, os animais foram sacrificados, e analisou-se expressão de CD86 e da molécula de MHC de classe II (IA^d) na superfície de células dendríticas (CD11c+) de pulmão. O p<0,05 em relação ao grupo não infectado (Branco).

4.5.4 - Avaliação histopatológica do pulmão de camundongos BALB/c

70 dias após o desafio

Os resultados descritos a seguir referem-se à análise de lâminas com cortes histológicos do pulmão de camundongos BALB/c previamente imunizados ou não, 70 dias após o desafio (Figuras 19, 20 e 21).

A análise histológica dos pulmões de animais não imunizados e infectados (PBS) mostrou grande comprometimento do parênquima pulmonar, caracterizado pela presença de granulomas isolados e também de granulomas confluentes. Esses granulomas constituíam-se predominantemente por macrófagos acompanhados de focos linfocitários, além da presença de poucos plasmócitos, geralmente perivascularres. Observamos também poucos neutrófilos. Apesar do alto comprometimento pulmonar, a coloração específica por Ziehl Nielsen, revelou a presença de poucos e esparsos bacilos, geralmente isolados ou agrupados.

Por outro lado, o grupo imunizado com PFC + CpG 1826 pela via subcutânea apresentou um comprometimento maior do parênquima pulmonar em relação ao grupo de animais não imunizados e infectados. Verificou-se a presença de granulomas confluentes com predomínio de macrófagos acompanhados de focos de linfócitos perivascularres e peribronquiais. Um pequeno número de plasmócitos também foi observado. Estes animais também apresentaram exsudato neutrofílico com áreas de necrose focal (detalhe na figura 20). Chamou-nos a atenção o fato de que os animais que apresentaram os maiores níveis de IFN- γ detectados no homogenato do pulmão foram também os que apresentaram necrose pulmonar, com a presença de uma quantidade exacerbada de neutrófilos formando extensos focos parenquimatosos, com oclusão de brônquios, acompanhado de edema difuso intenso. Nas lâminas coradas por Ziehl Nielsen observamos uma quantidade pequena a moderada de bacilos, superior

àquela encontrada no grupo não imunizado e infectado (PBS), geralmente agrupados dentro de macrófagos.

Quando os animais foram imunizados com PFC + CpG 1826 pela via intranasal, observou-se que, assim como na imunização pela via subcutânea, houve um elevado grau de comprometimento do parênquima pulmonar. Esses animais apresentaram formação de granulomas confluentes com predomínio de infiltrado macrofágico e presença de focos linfocitários perivasculares e peribronquiais e poucos neutrófilos esparsos no parênquima pulmonar. Contudo, ao contrário do grupo que recebeu a mesma imunização pela via subcutânea, não houve presença de focos de necrose no pulmão dos animais imunizados com PFC + CpG 1826 pela via intranasal. Nas lâminas contendo cortes histológicos, observou-se uma quantidade pequena a moderada de bacilos, geralmente presentes no interior de macrófagos.

O grupo imunizado com PFC + CpG 2041 apresentou um comprometimento pulmonar menor do que o grupo que recebeu PFC + CpG 1826 e semelhante ao grupo PBS, com a presença de granulomas isolados e confluentes, com o predomínio de macrófagos acompanhados de focos linfocitários. Observamos também a presença de raros plasmócitos e poucos neutrófilos raramente agrupados. Além disso, esse grupo apresentou um discreto edema focal difuso. A coloração específica também mostrou poucos bacilos isolados ao agrupados, semelhante ao grupo PBS.

No grupo imunizado com PFC em AIF verificamos um comprometimento do parênquima pulmonar menor do que aquele observado nos grupos descritos anteriormente, com a presença de granulomas isolados e de granulomas confluentes. Estes granulomas constituíam-se predominantemente de infiltrado linfocitário com localização perivascular, peribronquial e esparsos no parênquima, acompanhando de elevado número de macrófagos. Observamos também raros neutrófilos e ausência de

necrose pulmonar. A coloração por Ziehl Nielsen revelou a presença de poucos bacilos, geralmente isolados. Aparentemente este grupo foi o que melhor respondeu ao desafio por *M. tuberculosis*.

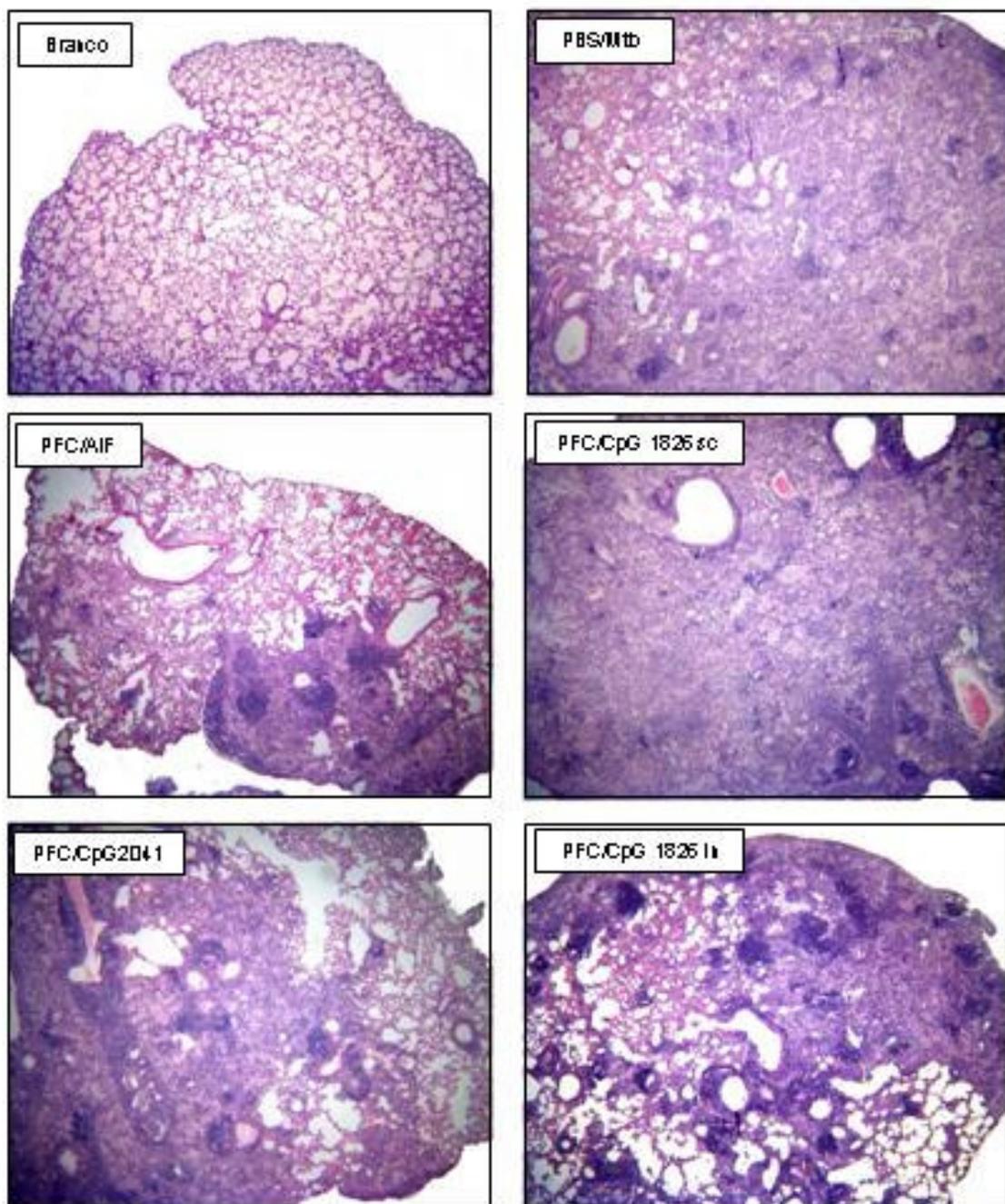


Figura 19: Avaliação histopatológica do pulmão dos animais imunizados e desafiados. Camundongos BALB/c foram imunizados com 50ug do antígeno PFC acrescido de 50ug de CpG 1826 (intranasal ou subcutâneo), 50ug de CpG 2041 ou em AIF, em 3 doses com intervalos de 7 dias. O grupo controle recebeu PBS por via subcutânea. Sessenta dias após a última imunização, os animais foram desafiados com *M. tuberculosis* H37Rv, 1×10^6 bacilos por via intratraqueal, ou receberam salina (grupo branco). Setenta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e o lóbulo superior direito do pulmão foi coletado para realização de cortes histológicos, que foram posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina. As figuras mostram um campo representativo do pulmão de um animal de cada grupo; foram analisados os pulmões de 3 animais por grupo. Aumento de 4 vezes.

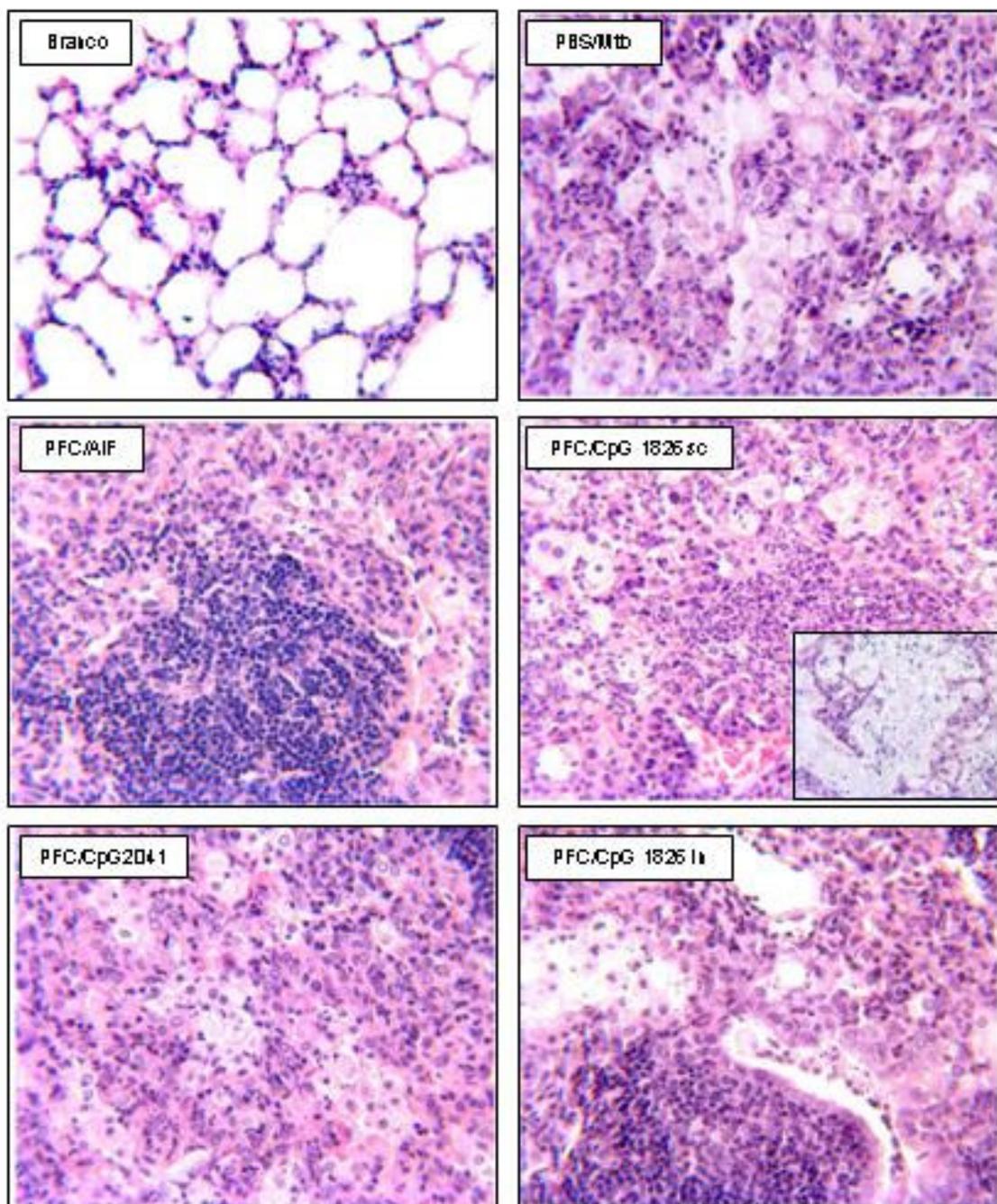


Figura 19: Avaliação histopatológica do pulmão dos animais imunizados e desafiados. Camundongos BALB/c foram imunizados com 50ug do antígeno PFC acrescido de 50ug de CpG 1826 (intranasal ou subcutâneo), 50ug de CpG 2041 ou em AIF, em 3 doses com intervalos de 7 dias. O grupo controle recebeu PBS por via subcutânea. Sessenta dias após a última imunização, os animais foram desafiados com *M. tuberculosis* H37Rv, 1×10^6 bacilos por via intratraqueal, ou receberam salina (grupo branco). Setenta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e o lóbulo superior direito do pulmão foi coletado para realização de cortes histológicos, que foram posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina. As figuras mostram um campo representativo do pulmão de um animal de cada grupo; foram analisados os pulmões de 3 animais por grupo. Aumento de 40 vezes.

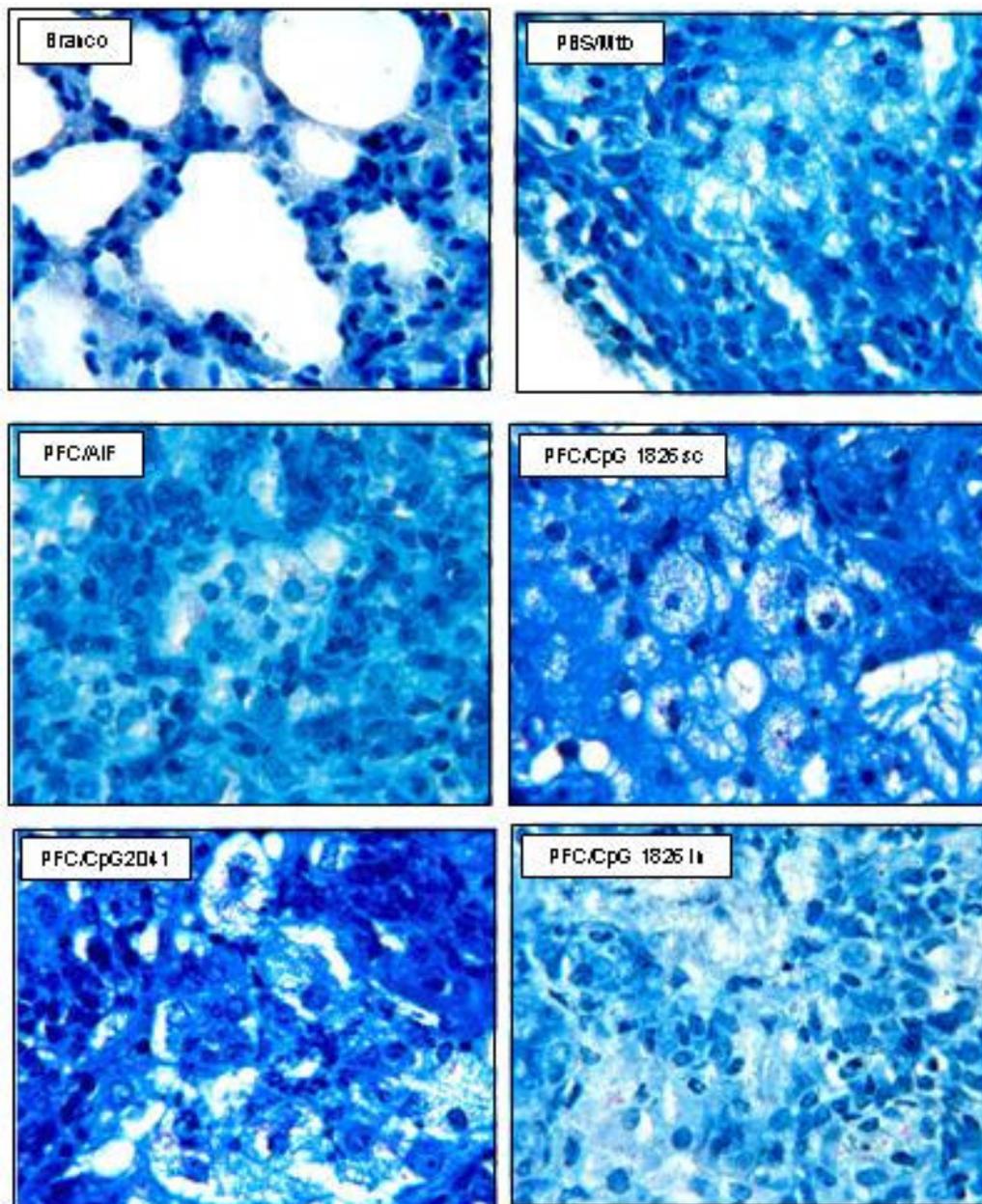


Figura 21: Avaliação histológica do pulmão dos animais imunizados e desafiados. Camundongos BALB/c foram imunizados com 50ug do antígeno PFC acrescido de 50ug de CpG 1826, 50ug de CpG 2041 ou em AIF, em 3 doses com intervalos de 7 dias. O grupo controle recebeu PBS por via subcutânea. Sessenta dias após a última imunização, os animais foram desafiados com *M. tuberculosis* H37Rv, 1×10^5 bacilos por via intratraqueal, ou receberam salina (grupo branco). Setenta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e o lóbulo superior direito do pulmão foi coletado para realização de cortes histológicos, que foram posteriormente corados por Ziehl Nielsen para a visualização do bacilo. As figuras mostram um campo representativo do pulmão de um animal de cada grupo; foram analisados os pulmões de 3 animais por grupo. Aumento de 100 vezes.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A proposta deste trabalho foi avaliar o potencial profilático de uma preparação vacinal em modelo experimental de TB. Esta preparação consistiu em uma solução de proteínas de filtrado de cultura (PFC) de *M. tuberculosis* acrescidas de motivos CpG (CpG-ODN), utilizados como adjuvante, sendo caracterizada, portanto, como uma vacina de subunidade.

Vacinas de subunidades baseadas na escolha de um antígeno apenas, purificado através da tecnologia do DNA recombinante, são consideradas seguras, mas na maioria das vezes, pouco eficientes (revisito por REED & LOBET, 2005). Dessa forma, uma preparação vacinal que contenha vários antígenos poderia ser considerada uma estratégia de imunização mais atraente. Adicionalmente, há evidências na literatura de que as proteínas secretadas ativamente por *M. tuberculosis* durante o período inicial de replicação da bactéria, após infecção do hospedeiro, induzem resposta imune celular associada com proteção contra TB (ANDERSEN, 2001; ROBERTS *et al.*, 1995; ANDERSEN *et al.*, 1994; PAL & HORWITZ, 1992; ANDERSEN *et al.*, 1991). Além disso, células mononucleares de sangue periférico de indivíduos PPD-positivos proliferam e secretam citocinas quando estimuladas com esses antígenos secretados (COLER *et al.*, 1998; BOESEN *et al.*, 1995; YOUNG *et al.*, 1992).

Andersen e colaboradores (1991) caracterizaram as proteínas secretadas por *M. tuberculosis* em diferentes tempos de cultura através de eletroforese (ANDERSEN *et al.*, 1991). Esses autores mostraram que após três dias de cultura, ocorria a presença de proteínas de 22-24 kDa e 45-50 kDa, secretadas inicialmente pelo bacilo. Nas culturas de 7 dias, observaram além dessas bandas, proteínas de 10-11 kDa, 30-35 kDa, 70-72 kDa, 17-19 kDa, 82 kDa, 38-41 kDa, além de outras pequenas bandas intermediárias a estes pesos. Culturas de 14 dias apresentaram o mesmo padrão, contudo, com maior quantidade de proteína nas bandas. Apesar de nossas amostras não terem apresentado as bandas de 22-

24 kDa e bandas de peso molecular superior a 70 kDa, evidenciamos um perfil similar de expressão protéica aos 14 dias de cultura.

Em função da quantidade das bandas e de proteínas presentes em cada banda, é possível que se adicionarmos uma quantidade ainda maior de PFC possamos revelar outras bandas de frações presentes em menor quantidade. Apesar de um pequeno número das proteínas constituintes do antígeno PFC estar devidamente identificado e caracterizado, estudos com eletroforese bidimensional revelaram a presença de pelo menos 200 componentes no filtrado de cultura de micobactéria (WELDINGH *et al.*, 2000; WELDINGH *et al.*, 1998).

Entre os antígenos que constituem a suspensão de PFC, encontram-se duas proteínas descritas como bons “alvos” para o desenvolvimento de vacinas contra a TB: a proteína ESAT-6 e a o antígeno 85B (LANGERMANS *et al.*, 2005; ZHU *et al.*, 2005; LUO *et al.*, 2004; PYM *et al.*, 2003; OLSEN, 2001; BRANDT *et al.*, 2000; BRANDT *et al.*, 1996). Recentemente, uma vacina BCG recombinante, ou seja, BCG expressando o antígeno 85B, foi descrita como protetora em ensaios pré-clínicos, e deverá passar à fase I de ensaios clínicos no ano de 2006 (HORWITZ *et al.*, 2005; HORWITZ *et al.*, 2000). Sable e colaboradores mostraram proteção contra a TB experimental após a imunização de camundongos com uma suspensão contendo uma fração dos antígenos secretados por *M. tuberculosis* com peso molecular abaixo de 40 kDa acrescida de adjuvante DDA-MPL. Essa fração continha os antígenos ESAT-6, CFP10, CFP32, CFP25, antígeno 85A e 85B. Como apresentado na figura 1 e na tabela 1, as proteínas ESAT-6, CFP10 e Ag85B parecem corresponder às bandas r17, r16 e r12 respectivamente. Portanto, a preparação vacinal que nos propusemos a testar parece conter antígenos imunodominantes descritos como protetores na TB experimental. Contudo, para confirmar a presença de tais antígenos seriam necessários métodos mais detalhados de análise, como realização de eletroforese em gel bidimensional ou de Western Blot.

As proteínas ESAT-6 e CFP10 estimulam a produção de IFN- γ por células T CD4+ e CD8+ e a atividade citotóxica de linfócitos T CD8+ em indivíduos com TB ativa e em modelos experimentais de TB (SHAMS *et al.*, 2004; KAMATH *et al.*, 2004; LAVANI *et al.*,

2001; AREND *et al.*, 2000; BRANDT *et al.*, 2000; RAVN *et al.*, 1999 LALVANI *et al.*, 1998; BRANDT *et al.*, 1996). Além disso, esses antígenos contêm vários epítomos que são restritos a cada um dos alelos das moléculas de MHC e outros epítomos que se ligam às múltiplas moléculas do MHC (SHAMS *et al.*, 2004). Vale ressaltar que o antígeno ESAT-6 já foi testado como vacina protéica em presença de adjuvantes (BRANDT *et al.*, 2000), como vacina de DNA (KAMATH *et al.*, 1999) e também foi testado conjuntamente ao antígeno 85B (Ag85B), na forma de proteína de fusão ESAT-6-Ag85B acrescida do adjuvante DDA-MPL. Essa formulação apresentou efeito profilático contra TB em camundongos e primatas não humanos (LANGERMANS *et al.*, 2005; OLSEN *et al.*, 2001).

O Ag85B é uma proteína altamente imunogênica secretada por *M. tuberculosis* que faz parte do complexo Ag85. Esse complexo é constituído pelos antígenos 85A, 85B e 85C, que são proteínas de 30 a 32 kDa com função de micolil-transferase, essencial para a formação da parede celular do bacilo. Ambos os antígenos 85A e 85B são reconhecidos por linfócitos T de indivíduos PPD-positivos (SILVER *et al.*, 1995). Além disso, o efeito profilático dessas proteínas também já foi testado na TB experimental, tanto em presença de adjuvantes, como na forma de vacina de DNA e até mesmo como vacinas vetorizadas (McSHANE *et al.*, 2005; ZHU *et al.*, 2005, DIETRICH *et al.*, 2005; McSHANE *et al.*, 2004; FENG *et al.*, 2001; HORWITZ *et al.*, 2000; KAMATH *et al.*, 1999; LOZES *et al.*, 1997; HUYGEN *et al.*, 1996). Neste último caso, já foi testado o vírus Ankara recombinante que expressava o antígeno 85A e também o BCG recombinante que expressava o antígeno 85B (McSHANE *et al.*, 2005; McSHANE *et al.*, 2004; HORWITZ *et al.*, 2000).

Além dos antígenos descritos acima, outras proteínas secretadas pelo bacilo são imunogênicas (ATTANASIO *et al.*, 2000; ROSENKRANDS *et al.*, 1998) e através do perfil eletroforético apresentado na figura 1 e na tabela 1, podemos sugerir que correspondam às proteínas detectadas em nossa preparação vacinal.

Por outro lado, a proteína de 32kDa (CFP32), que poderia corresponder à banda r11 (tabela 1), parece estar relacionada com a produção de IL-10 durante a infecção. Huard e colaboradores (2003) verificaram que a presença de CFP32 em escarro de pacientes com

TB ativa correlacionava-se positivamente com os níveis de IL-10. Esses resultados sugerem que a proteína CFP32 estimula a produção de IL-10 que, por sua vez, modula negativamente a resposta inflamatória na TB (HUARD *et al.*, 2003).

É importante ressaltar, que não foi revelada a banda correspondente à proteína de 65kDa. A presença desta proteína no sobrenadante de cultura é descrita como indicativo de autólise da bactéria (ANDERSEN *et al.*, 1991). Dessa forma, podemos inferir que não houve lise bacteriana durante a cultura e por isso, o PFC utilizado em nosso trabalho é de fato constituído apenas pelas proteínas secretadas por *M. tuberculosis*.

Com base nos dados descritos na literatura (LINDBLAD *et al.*, 1997; ROBERTS *et al.*, 1995; ANDERSEN *et al.*, 1994; HUBBARD *et al.*, 1992), selecionamos diferentes concentrações de PFC e de motivos CpG 1826 com a finalidade de padronizar a dose do antígeno e do adjuvante, respectivamente, a serem utilizadas nos protocolos de imunização. Verificamos que todos os animais imunizados com diferentes concentrações de PFC e CpG 1826 apresentaram produção significativa de anticorpos IgG1 antígeno-específicos em relação aos animais não imunizados e aos níveis detectados nos soros pré-ímmunes (Figura 2). Somente os grupos imunizados com 50 µg de antígeno PFC e 30 µg de CpG 1826 ou 100 µg de PFC e 30 µg de CpG produziram níveis significativos de anticorpos IgG2a. Animais imunizados com 50 µg de PFC e 50 µg de CpG também produziram níveis elevados de IgG2a. No entanto, em virtude do número de animais avaliados (n=3) e do desvio-padrão das amostras, não obtivemos um dado significativo. Além disso, também detectamos produção significativa de IFN-γ e IL-10 por células de baço de animais imunizados com as diferentes concentrações de PFC e CpG após estimulação antígeno-específica *in vitro* (Figuras 3 e 4).

Considerando a produção de IFN-γ, e IL-10, podemos sugerir que a re-estimulação das células dos animais imunizados com PFC e CpG 1826 induziu ativação dos clones de linfócitos T antígeno-específicos, que foram gerados durante as imunizações. Apesar de não ter havido diferenças estatisticamente significativas entre os grupos imunizados, os animais

que receberam 50 µg de PFC + 50 µg de CpG 1826 sintetizaram níveis elevados de anticorpos IgG2a, de IFN-γ e mais baixos de IL-10. Estes dados sugerem que a imunização com PFC e CpG 1826 estimulou preferencialmente a diferenciação de linfócitos T efetores e de memória de padrão Th1. Entretanto, para confirmar a presença dessas células de memória seria necessário detectar a expressão e determinados marcadores de superfície que nos últimos anos têm sido empregados para a diferenciar essa população celular dos linfócitos ativados, como CD44, CD62L, CD45RB, CCR7, CD122 entre outros.

O IFN-γ é responsável pela ativação de mecanismos microbicidas de macrófagos, estimula a expressão de moléculas de MHC de classe I e II e de moléculas coestimulatórias na superfície das APCs. Além disso, essa citocina promove a troca de isotipo de imunoglobulinas para anticorpos opsonizantes, como por exemplo, IgG2a em camundongos (ABBAS, LITCHIMAN & POBER, 2004). Animais geneticamente deficientes para a produção de IFN-γ são muito susceptíveis à infecção por *M. tuberculosis* (COOPER *et al.*, 1993; FLYNN *et al.*, 1993). Em função disso, acredita-se que a presença de células T efetoras e de memória produtoras de IFN-γ possa definir o direcionamento da resposta imune do hospedeiro diante de uma situação de infecção com *M. tuberculosis*. Nesse sentido, o desenvolvimento de vacinas contra a TB deve se basear na escolha de antígenos que estimulem a resposta Th1 e o monitoramento da eficácia vacinal deve incluir ensaios que permitam a avaliação deste padrão de resposta (REED *et al.*, 2003). Portanto, o esquema de vacinação com PFC e CpG 1826 foi selecionado de acordo com a estratégia que induziu uma maior produção de IFN-γ.

Além da citocina IL-10, também julgamos importante avaliar a produção de IL-4, como citocina de padrão Th2. Apesar da elevada sensibilidade do ensaio, não detectamos IL-4 nos sobrenadantes de cultura de baço de animais imunizados com as diferentes concentrações de PFC e CpG frente a estímulo antígeno-específico. A produção foi evidente apenas com estimulação policlonal. Apesar disso, não é possível afirmar que a imunização com PFC e CpG 1826 não induziu a expansão de clones de linfócitos T de perfil Th2

produtores de IL-4, pois a detecção desta citocina apresenta algumas peculiaridades. A IL-4 é produzida em baixas concentrações, tem uma meia vida muito curta e liga-se rapidamente ao seu receptor na superfície celular. Além disso, poucas cópias do RNA mensageiro para IL-4 são produzidas e parecem ter meia-vida curta devido à rápida degradação (revisto por ROOK *et al.*, 2004).

Em função desses resultados definimos como concentrações a serem utilizadas nos protocolos de imunização: 50 µg de antígeno PFC acrescidas de 50 µg do adjuvante CpG 1826. Para dar continuidade aos ensaios de imunogenicidade, introduzimos dois grupos experimentais aos protocolos de imunização: antígeno PFC acrescido de seqüências CpG não estimulatórias (CpG 2041) e PFC emulsificado em Adjuvante Incompleto de Freund (AIF). O primeiro grupo foi usado como controle negativo e o segundo, como controle positivo para a vacina PFC + CpG 1826. Todos os animais imunizados com PFC, independentemente do adjuvante empregado, produziram níveis significativos de anticorpos IgG1 em relação ao grupo não imunizado. Contudo, apenas o grupo que recebeu PFC + CpG 1826 apresentou produção significativa de anticorpos IgG2a.

Diversos trabalhos da literatura mostram a indução de anticorpos específicos de ambas as subclasses após imunização com PFC. Andersen e colaboradores (1994) descreveram que a imunização com PFC, juntamente com diferentes adjuvantes, era capaz de induzir altos títulos de anticorpos IgG1 e IgG2a, sendo os títulos de cada subclasse variáveis de acordo com a concentração de antígeno empregada na imunização. Altas doses de antígeno induziram principalmente anticorpos da subclasse IgG1 (ANDERSEN *et al.*, 1994).

A indução de uma determinada subclasse de anticorpo também é influenciada pelo adjuvante empregado. A administração de antígenos secretados por micobactéria em camundongos C57BL/6 juntamente com o adjuvante AIF ou hidróxido de alumínio estimulou a produção de altos títulos de anticorpos específicos IgG1, enquanto o uso de DDA auxiliou a produção de IgG2a (LINDBLAD *et al.*, 1997). Outro trabalho da literatura empregando o antígeno HEL (do inglês hen egg lysozyme) mostrou que a imunização de camundongos

BALB/c com o antígeno juntamente com motivos CpG 1826 induziu altos títulos de anticorpos de subclasse IgG2a enquanto o mesmo antígeno em presença de AIF, estimulou a produção de IgG1 (CHU *et al.*, 1997).

Os resultados que obtivemos em nossos experimentos corroboram com os dados de Chu e colaboradores. A imunização com PFC e CpG 1826 foi capaz de direcionar não apenas uma resposta humoral predominantemente IgG1, para uma resposta mista IgG1/IgG2a, mas também foi capaz de direcionar o desenvolvimento de uma resposta celular. Enquanto a imunização com PFC e CpG 1826 estimulou a produção de concentrações mais elevadas de IFN- γ e mais baixas de IL-5 e IL-10, a imunização com o mesmo antígeno emulsificado em AIF induziu síntese de concentrações mais elevadas de IL-5 e IL-10, mas também de IFN- γ . Neste contexto, podemos sugerir que o adjuvante utilizado parece modular o padrão da resposta imune desencadeada pela imunização com um mesmo antígeno, as proteínas de filtrado de cultura (PFC).

Entretanto, foi com surpresa que constatamos que a preparação PFC e CpG 1826 não foi capaz de conferir proteção significativa contra o desafio com *M. tuberculosis*. Houve uma redução de aproximadamente 0,5 Log₁₀ em relação ao grupo não imunizado e infectado enquanto a imunização com PFC emulsificado em AIF induziu uma redução significativa de 1,2 Log₁₀.

Diante deste resultado inesperado, retornamos aos trabalhos da literatura e comparamos os esquemas de imunização utilizando PFC com relação ao número de doses administradas, concentração do antígeno, adjuvante utilizado, intervalos entre as doses, “janela imunológica”, ou seja, intervalo entre o esquema de imunização e o desafio, período de infecção no qual avaliou-se a proteção (BRANDT *et al.*, 2000; ROBERTS *et al.*, 1995; ANDERSEN *et al.*, 1994; ANDERSEN & HERON, 1993; HUBBARD *et al.*, 1992).

Hubbard e colaboradores (1992) mostraram que a imunização de camundongos B6D2 (híbrido de C57BL/6 e DBA/2) pela via subcutânea com 20 μ g de PFC em AIF, duas doses com intervalos de 3 semanas, induziu proteção quando os animais foram desafiados

com 10^3 bacilos por aerosol, 3 semanas após a última imunização, sendo a proteção avaliada 1, 2 ou 3 semanas após desafio (HUBBARD *et al.*, 1992). O uso de um protocolo experimental diferente também mostrou proteção em camundongos C57BL/6 imunizados com 30 ou 100 μg de PFC administrado juntamente com DDA em 3 doses semanais. Neste trabalho, os animais foram desafiados com 5×10^4 bacilos pela via intravenosa, 12 ou 14 semanas após a última imunização e a proteção foi avaliada 2 semanas após o desafio (ANDERSEN *et al.*, 1994).

Em um outro trabalho, também com camundongos C57BL/6, empregou-se a imunização com 20, 50 ou 100 μg de PFC juntamente com AIF pela via subcutânea, em 3 doses com intervalos de 3 semanas, seguidas de desafio após 1, 3 ou 5 meses do final das imunizações, contudo a proteção observada não foi de longa duração (ROBERTS *et al.*, 1995). Lindblad e colaboradores imunizaram camundongos C57BL/6 com 3 doses de 25 μg de antígeno PFC acrescido de DDA, em intervalos de 1 semana, pela via subcutânea, e constataram proteção quando os animais foram desafiados pela via intravenosa 15 ou 27 semanas após as imunizações, sendo a proteção avaliada 2 semanas após o desafio (LINDBLAD *et al.*, 1997).

Em nosso trabalho, utilizamos modelo experimental de TB com camundongos BALB/c. Esses animais foram imunizados com 3 doses de 50 μg de PFC em intervalos semanais, pela via subcutânea. Como adjuvante, utilizamos motivos CpG 1826 (50 μg). O intervalo entre as imunizações foi escolhido com base em trabalhos da literatura. No entanto, é possível que imunizações muito próximas possam desencadear eliminação de clones de células T ativadas devido ao excesso de administração do antígeno, o que poderia, talvez, estar relacionado com a falta de proteção representada por nossos dados.

A via de administração do antígeno também deve ser considerada como fator determinante do perfil de resposta imune induzida. Em nosso trabalho, testamos uma via parenteral, a subcutânea. Além disso, os animais foram desafiados 2 meses após a última imunização, e a proteção foi avaliada no pulmão dos animais 70 dias após o desafio.

Optamos por utilizar períodos mais longos tanto para o desafio quanto para a avaliação da proteção, pois acreditamos que a eficácia de uma vacina depende, além do perfil de resposta imune induzida, da capacidade de diferenciação de células de memória de longa duração.

Outro fator que diferencia nossos trabalhos de outros descritos na literatura e que pode interferir nos resultados obtidos é a via utilizada para o desafio com *M. tuberculosis*. Na maioria dos trabalhos, o desafio é realizado por aerosol. Alguns utilizam a via intravenosa e poucos utilizam a via intraperitoneal. Nós empregamos a via intratraqueal. Embora o inóculo de *M. tuberculosis* seja elevado no desafio pela via intratraqueal em relação ao desafio por aerosol, é uma via que se aproxima mais da via de infecção natural do hospedeiro, quando se considera a via intravenosa e a intraperitoneal. Além disso, quando se realiza a infecção ou desafio por via intratraqueal, os bacilos inicialmente atingem o pulmão e, posteriormente, com a disseminação da infecção, atingem os linfonodos e o baço. Na infecção intravenosa, os bacilos atingem inicialmente o baço, e apenas mais tardiamente, a infecção apresentará localização pulmonar. Isso deve interferir na indução da resposta imune, na cinética e compartimento escolhido para avaliação dessa resposta e, conseqüentemente, nos dados que serão obtidos sobre a relação parasita-hospedeiro.

Através de uma análise conjunta dos nossos resultados e uma avaliação dos resultados da literatura, nos propusemos a estudar outra via de imunização, a intranasal. A ativação de uma imunidade de mucosa pode ser importante para o desenvolvimento de resposta protetora contra infecções do trato respiratório. Alguns trabalhos descreveram a eficácia protetora do BCG contra a TB, quando administrado por via intranasal em relação às vias parenterais (SANTOSUOSSO *et al.*, 2005; HAILE *et al.*, 2005; LYADOVA *et al.*, 2001). Mais recentemente, GIRI e colaboradores (2005) descreveram que a imunização de camundongos com proteínas secretadas por *M. tuberculosis* (PFC) em DDA por via intranasal conferiu melhor proteção contra TB experimental quando comparada à imunização por via subcutânea. No entanto, quando camundongos foram imunizados com PFC e CpG

1826 pela via intranasal, constatamos que houve um aumento significativo no número de UFC (Figura 8).

Outros modelos experimentais também foram utilizados para avaliar o efeito profilático do antígeno PFC contra a TB. A imunização de cobaias com PFC emulsificado em AIF conferiu efeito protetor após desafio com *M. tuberculosis* (PAL & HORTWZ, 1992). Além disso, Hogarth e colaboradores (2003) descreveram que cobaias imunizadas com PFC juntamente com motivos CpG desenvolveram uma resposta Th1 antígeno- específica. Essa resposta caracterizou-se pela indução de uma intensa reação de hipersensibilidade tipo IV, produção de IFN- γ por células de baço e síntese de anticorpos IgG2a antígeno-específicos (HOGARTH *et al.*, 2003). O papel do antígeno PFC como imunógeno protetor contra a TB também foi descrito para animais de maior porte. Estes antígenos em presença de motivos CpG conferiram proteção contra a TB bovina (WEDLOCK *et al.*, 2005).

Além da via de imunização e do modelo experimental, o adjuvante utilizado também pode direcionar o padrão da resposta imune, conforme descrevemos anteriormente, e conseqüentemente, a eficácia protetora de uma vacina. Os motivos CpG têm sido empregados no favorecimento de resposta imune Th1 (WEDLOCK *et al.*, 2005; VERTHELYI *et al.*, 2001; TASCAN *et al.*, 2000; HARTMAN *et al.*, 2000; KRIEG *et al.*, 1999). Entretanto, a adição de CpG à preparação vacinal baseada em antígeno PFC acrescido de DDA ou de MPL, não resultou em aumento do efeito protetor da vacina (HSIEH *et al.*, 2004).

Em síntese, todos esses fatores: adjuvante, dose de antígeno, via de administração, intervalos entre imunizações, período e via de desafio e período avaliação da proteção podem interferir na eficácia protetora de uma formulação vacinal. Assim, em função dos resultados do experimento de proteção, fomos avaliar como se encontrava a resposta imune no pulmão destes animais, uma vez que em experimentos de imunogenicidade, a vacina experimental PFC e CpG 1826 estimulou um perfil de resposta que julgávamos ter potencial protetor.

O desenvolvimento de uma vacina eficiente contra a TB deve ser embasado no bom entendimento da relação patógeno-hospedeiro, e nesse contexto, o local onde se estabelece a infecção é essencial.

Durante a infecção por *M. tuberculosis* ocorre a fagocitose do bacilo por macrófagos alveolares seguida de ativação da resposta imune inata, com a produção de IL-12 que é secretada por macrófagos e células dendríticas (DOHERTY & ANDERSEN, 2005; FLYNN, 2004; HENDERSON *et al.*, 1997; LADEL *et al.*, 1997a; FLYNN *et al.*, 1993). Além de IL-12, os fagócitos também produzem TNF- α , IL-6, IL-1 e IL-8 que exacerbam a resposta inflamatória induzida pelo bacilo. Essa inflamação é caracterizada pelo recrutamento de neutrófilos, monócitos e precursores de células dendríticas, bem como de linfócitos que foram previamente ativados nos linfonodos. A presença de IL-12 no microambiente pulmonar contribui para ativar as funções efetoras dos linfócitos T CD4+ diferenciados em Th1, produtores de IFN- γ , recrutados para o pulmão. Já foi descrito que TNF- α , IL-6 e IL-12 são citocinas associadas com uma resposta protetora contra TB. Animais geneticamente deficientes dessas citocinas não sobrevivem por períodos prolongados após desafio com cepa virulenta de *M. tuberculosis* (FLYNN, 1997, LADEL *et al.*, 1997b; COOPER *et al.*, 1997; FLYNN *et al.*, 1995). A administração de TNF- α juntamente com IFN- γ aumenta a atividade microbicida de macrófagos murinos *in vitro* (FLYNN, 2004). Também é descrito que a administração de IL-12 recombinante aumenta a sobrevivência de camundongos BALB/c desafiados com o bacilo (COOPER *et al.*, 1997; FLYNN *et al.*, 1995). Os níveis elevados de IL-12 devem ser mantidos durante as fases mais tardias da infecção para assegurar a eficácia dos mecanismos efetores da imunidade adquirida, que possibilitam o controle da infecção (FENG *et al.*, 2005).

Em síntese, pela própria localização intravesicular do patógeno em macrófagos, monócitos e células dendríticas, e em decorrência da persistente estimulação antigênica, a doença apresenta caráter granulomatoso resultante de intensa resposta inflamatória. Essa resposta caracteriza-se principalmente pela ativação de linfócitos de padrão Th1 e pela

presença de IL-12 e TNF- α no local da infecção. Indivíduos com TB ativa e animais infectados com bacilos desenvolvem uma resposta de padrão Th1 (revisado por SALGAME, 2005).

Citocinas de padrão Th2 também podem estar presentes no local da infecção. A IL-10 é uma citocina descrita tanto como de perfil Th2, como também uma citocina com função regulatória. Ela regula negativamente a ativação de linfócitos e macrófagos. Além disso, a IL-10 inibe a proliferação de células T e a produção de IL-12 e IFN- γ , diminui a expressão de moléculas coestimulatórias e de classe I e II do MHC na superfície de APCs e inibe a produção de mediadores inflamatórios, como TNF- α , e a produção de NO (TURNER *et al.*, 2002; FLESCH *et al.*, 1994; ROJAS *et al.*, 1999; CHADBAN *et al.*, 1998; MALEFYT *et al.*, 1993; MALEFYT *et al.*, 1991; FIORENTINO *et al.*, 1991). No entanto, a presença de IL-10 no local da infecção pode ser importante para controlar a resposta inflamatória e a excessiva ativação de linfócitos Th1, evitando o dano tecidual. Em estudos para identificação dos fatores que causam necrose em granulomas, Ehlers e colaboradores descreveram que a ausência de IL-10 acelerou a formação de focos de necrose nos granulomas, provavelmente em função do aumento na produção de IFN- γ (EHLERS *et al.*, 2001). Por outro lado, a regulação negativa da resposta imune celular pode ser prejudicial para a eliminação do bacilo. Camundongos geneticamente deficientes de IL-10 apresentaram aumento da imunidade contra a micobactéria, embora o melhor controle sobre a replicação dos bacilos não estivesse associado ao aumento da produção de IFN- γ (MURRAY & YOUNG, 1999). Além disso, camundongos transgênicos que expressavam níveis aumentados de IL-10 apresentaram reativação da doença (TURNER *et al.*, 2005).

Dessa forma, a infecção por *M. tuberculosis* induz a produção de uma série de citocinas que atuam como mediadores inflamatórios ou regulando a resposta imune. Sendo assim, a imunização pode modular positivamente uma resposta associada com proteção. Dentro deste contexto, a escolha do adjuvante empregado pode representar papel essencial nessa modulação da resposta imune.

Apesar da imunização com PFC e CpG 1826 por via subcutânea não ter protegido os animais desafiados, houve maior produção de IFN- γ e IL-6, e menor produção de TGF- β nos pulmões desses animais em relação aos animais imunizados com PFC emulsificado em AIF. Ambos os grupos produziram níveis similares de IL-5, IL-12, TNF- α e IL-10. Quando comparamos os cortes histológicos, constatamos intenso infiltrado de macrófagos e menor de linfócitos, constituindo granulomas que preenchem toda a extensão do parênquima pulmonar, além da existência de áreas de necrose nos pulmões de animais imunizados com PFC e CpG 1826. Em contrapartida, animais imunizados com PFC emulsificado em AIF apresentaram uma melhor preservação do parênquima pulmonar, presença de granulomas com intensos infiltrados de linfócitos e macrófagos, e ausência de necrose.

Nesse sentido, parece que a magnitude ou o “tamanho” da resposta Th1, considerando-se a produção de IFN- γ , não pode ser considerada como parâmetro único associado com proteção na TB. Hovav e colaboradores (2005) descreveram um aumento na eficácia protetora da vacina constituída pelos antígenos ESAT-6, antígenos de 38kDa e 16kDa, Ag85B, CFP21 e Mtb8.4 em MPL e DMT quando introduziu-se IFN- γ como um terceiro adjuvante. Esses autores também descreveram que doses elevadas de IFN- γ revelaram-se prejudiciais e sugeriram que a magnitude pode não se associar à proteção. De fato, foi descrito que o excesso de IFN- γ pode levar à apoptose de clones de linfócitos T CD4+ responsivos a micobactérias (FLORIDO *et al.*, 2005; DALTON *et al.*, 2000).

Hovav e colaboradores (2003) descreveram que a imunização de camundongos BALB/c com a lipoproteína de 27 kDa, secretada por *M. tuberculosis*, acrescida de DDA, MPL ou Ribi induziu uma intensa resposta de hipersensibilidade tipo IV, elevada produção de IFN- γ e NO por células de baço e altos níveis de anticorpos IgG2a no soro dos animais. Apesar da intensa resposta imune celular, após o desafio houve um aumento no número de bacilos no pulmão. Um fenômeno similar foi descrito para outros antígenos micobacterianos, como a lipoproteína de 19 kDa. Apesar de ter induzido uma resposta Th1, esse antígeno apresentou um efeito deletério sobre a proteção quando expresso por cepas recombinantes

de *Mycobacterium vaccae* e *Mycoabcterium smegmatis*, que conferiam proteção enquanto cepas selvagens (não recombinantes) (YEREMEEV *et al.*, 2000; ABOU-ZEID *et al.*, 1997).

Por outro lado, a indução de uma resposta imune de padrão misto pode estar associada com proteção. Sable e colaboradores (2005) imunizaram camundongos C57BL/6 com uma fração do antígeno PFC acrescida de adjuvante DDA-MPL. Essa imunização induziu uma resposta imune mista, com produção de IFN- γ e IL-4 por células do baço após reestimulação *in vitro*. Após o desafio com *M. tuberculosis* pela via intravenosa, houve proteção significativa dos animais vacinados.

Desse modo, a produção de citocinas, como IL-4, IL-10 e TGF- β , que modulam negativamente a resposta inflamatória, pode também ser relevante para avaliar a eficácia de uma preparação vacinal. Obviamente, uma produção excessiva dessas citocinas a ponto de reverter a razão Th1/Th2 poderia bloquear o efeito protetor de uma resposta Th1.

Outro aspecto interessante a ser abordado na escolha de antígenos com potencial vacinal ou no desenvolvimento de novas estratégias profiláticas contra a TB é o retorno da discussão sobre o fenômeno de Kock. Esse fenômeno está relacionado a uma intensa reação inflamatória que ocorre no local da infecção, quando um indivíduo com a doença ativa entra em contato com antígenos micobacterianos do tipo tuberculina (ROOK & HERNANDEZ PANDO, 1996). Moreira e colaboradores mostraram que a inoculação de antígenos de BCG e de *M. tuberculosis* em camundongos previamente infectados com o bacilo gerava uma intensa resposta inflamatória, com aumento na produção de TNF- α e IL-6, associado com a exacerbação da doença. Além disso, o tratamento de camundongos infectados com BCG expressando TNF- α , IL-2 ou IFN- γ também aumentou o comprometimento pulmonar (MOREIRA *et al.*, 2002).

Diante de todo o contexto exposto, acreditamos que os diferentes adjuvantes empregados nas nossas imunizações com o antígeno PFC tenham modulado a ativação do sistema imune, direcionando a geração de respostas distintas. Nos animais imunizados com CpG 1826, houve uma produção muito elevada de IFN- γ e de IL-6 e mais baixa de TGF- β ,

ausência de proteção acompanhada de grande comprometimento pulmonar com a presença de focos de necrose. Já o antígeno em presença de AIF modulou negativamente a produção de IFN- γ e positivamente a produção de TGF- β , gerando uma resposta protetora acompanhada de melhor preservação do pulmão. Todos estes dados parecem não estar relacionados com o número de linfócitos T CD4+ e B, macrófagos (células CD11b+) e células dendríticas (células CD11c+), nem com a produção de óxido nítrico (NO) detectados no pulmão, uma vez que todos os grupos infectados, imunizados ou não, comportaram-se de modo similar, com exceção ao número de células CD8+, que foi significativamente menor que o número detectado no pulmão de animais não imunizados e infectados. A administração do antígeno com CpG 1826 pela via intranasal modulou negativamente a produção de IL-10 e positivamente a produção de IL-12, sem resultar em proteção. Pelo contrário, houve um aumento no número de bacilos em relação aos animais não imunizados e infectados. Essas informações poderão ser úteis para o delineamento de novas vacinas contra TB.

De acordo com Rook e colaboradores (2005a e 2005b), a micobactéria é patogênica não porque falha em induzir uma resposta Th1, ou porque causa uma modulação negativa dessa resposta, mas sim porque induz uma resposta imune de padrão Th1 “corrompida”. Essa resposta causa uma intensa inflamação, mas não é capaz de eliminar o bacilo. Segundo estes autores, no início da infecção por *M. tuberculosis*, ocorre a indução de uma resposta Th1 que vai diminuindo em intensidade com a progressão da doença, quando tem início uma produção de IL-4. A presença de IL-4 nesse ambiente inflamatório predominantemente Th1, por mecanismos ainda não esclarecidos, leva à toxicidade do TNF- α que contribui para a progressão da doença (HERNANDEZ-PANDO *et al.*, 1997a, ROOK *et al.*, 2004). Em camundongos deficientes de IL-4, a toxicidade do TNF- α e indução de fibrose são reduzidas (HERNANDEZ-PANDO *et al.*, 2004).

Esses resultados podem ser extrapolados para as populações humanas, para explicar alguns aspectos relacionados à falta de eficácia da vacina BCG e da elevada

incidência e TB em determinados locais. Nos países em desenvolvimento, onde existe elevada incidência de exposição a parasitas, como os helmintos, e também a micobactérias ambientais, ocorre a produção de IL-4 pelo hospedeiro. Quando o indivíduo é infectado pela micobactéria, ocorre o desenvolvimento de uma resposta inflamatória predominantemente Th1, mas com alguma produção de IL-4. Mesmo que essa resposta Th1 tenha uma elevada amplitude, a presença de IL-4 pode inibir os mecanismos microbicidas dos macrófagos, diminuindo, por exemplo, a expressão da enzima óxido-nítrico sintase (iNOS), pode induzir a toxicidade do TNF- α e também fibrose, levando à progressão da doença (ROOK *et al.*, 2004, 2005a e 2005b; ANDERSEN & DOHERTY, 2005).

Uma nova vacina contra a TB precisa exercer um efeito modulador sobre o sistema imune e não simplesmente polarizar a resposta para um padrão Th1. A infecção pela micobactéria por si só é capaz de induzir uma forte resposta de padrão Th1. No entanto, os indivíduos que são infectados podem desenvolver a doença por dois motivos: pela indução de uma resposta regulatória exacerbada, caracterizada pela presença prévia de células produtoras de IL-4 e/ou de IL-10, ou pelo desenvolvimento de intensa resposta inflamatória Th1 com lesão do tecido pulmonar. Portanto, uma estratégia de imunização deve intervir nestas respostas de modo a gerar um efeito protetor e ausência de dano tecidual.

Os dados apresentados em nosso trabalho contribuem para um melhor entendimento da relação patógeno-hospedeiro e abrem perspectivas para a elaboração de estratégias profiláticas que modulem a ativação da resposta imune após a infecção com *M. tuberculosis*. Diferentes antígenos podem necessitar de adjuvantes específicos para serem eficientes. Diante dos resultados apresentados, uma estratégia interessante também poderia ser a utilização de PFC como um reforço da vacina BCG. Além disso, é preciso reavaliar o atual paradigma de que apenas a produção de níveis elevados de IFN- γ seria um marcador de proteção no desenvolvimento de novas vacinas contra a TB.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que:

1) A imunização de camundongos BALB/c com o antígeno PFC acrescido de CpG 1826, CpG 2041 ou AIF induziu ativação da resposta imune, caracterizada pela produção antígeno-específica de anticorpos séricos e citocinas por células de baço após re-estimulação *in vitro*. O adjuvante empregado juntamente com o antígeno PFC e a via de imunização modularam o perfil da resposta induzida.

2) Camundongos imunizados com a suspensão de PFC e CpG 1826 pela via subcutânea apresentaram uma resposta imune mais direcionada para um padrão Th1, apesar da produção de IFN- γ e IL-10. Após o desafio, apesar do aumento na produção de IFN- γ , em relação à produção de TGF- β , não houve proteção. Os animais apresentaram grande comprometimento do parênquima pulmonar, com presença de necrose.

3) Camundongos imunizados com a suspensão de PFC emulsificada em AIF, pela via subcutânea, apresentaram uma resposta imune de padrão misto Th1/Th2 com produção de IFN- γ , IL-5 e IL-10 por células de baço e de anticorpos da subclasse IgG1. Essa imunização protegeu os animais contra posterior desafio com *M. tuberculosis*, com redução significativa no número de UFC e menor comprometimento do parênquima pulmonar. No pulmão desses animais houve uma modulação negativa na produção de IFN- γ e modulação positiva da citocina anti-inflamatória TGF- β .

4) A administração de PFC e CpG 1826 pela via intranasal induziu uma alteração no padrão de resposta imune no pulmão dos animais desafiados, com aumento dos níveis de IL-12, redução de IL-10 e ausência de proteção

5) Na ausência de adjuvante, a imunização com o antígeno protéico acrescido de CpG 2041 (não estimulatório), induziu apenas uma resposta imune humoral caracterizada pela produção de anticorpos antígeno-específicos da subclasse IgG1.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.; LITCHMAN, A and POBER, J. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 5.ed. cap.9.
- ABBAS, A.; LITCHMAN, A and POBER, J. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 5.ed. cap.11.
- ABEL, B. et al. Toll-Like Receptor 4 expression is required to control chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. **J. Immunol.**, v. 169: p. 3155-62, 2002.
- ABOU-ZEID, C. et al. Induction of a type 1 immune response to a recombinant antigen from *Mycobacterium tuberculosis* expressed in *Mycobacterium vaccae*. **Infect. Immun.**, v. 65: p. 1856-62, 1997.
- ADDAMS, D. O. The granulomatous inflammatory response. **Am. J. Pathol.**, v. 84: p. 164-91, 1976.
- ANDERSEN, P. and DOHERTY, T. M. The success and failure of BCG – implications for a novel tuberculosis vaccine. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3: p. 656-62, 2005.
- ANDERSEN, P. TB vaccines: progress and problems. **Trends immunol.**, v. 22: p. 160-8, 2001.
- ANDERSEN, P. et al. Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. **Infect. Immun.**, v. 62(6): p. 2536-44, 1994.
- ANDERSEN, P. and HERON I. Specificity of a protective memory immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, v. 61(3): p. 844-51, 1993.
- ANDERSEN, P. et al. Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. **Infect. Immun.**, v. 19(6): p. 1905-910, 1991.
- Anonymous. Global tuberculosis control – surveillance, planning, financing. **W.H.O. / HTM / TB / 2005**, World Health Organization Geneva, Switzerland, 2005.
- APOSTOLOU, I. et al. Murine natural killer cells contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls. **PNAS**, v. 96: p. 5141-6, 1999.
- ARREND, S. M. et al. Antigenic equivalence of human T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and culture filtrate protein 10 and to mixtures of synthetic peptides. **Infect. Immun.**, v. 68: p. 3314-9, 2000.
- ARRIAGA, A. K. et al. Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. **Clin. Exp. Immunol.** V.128: p.229-37, 2002.
- ATTANASIO, R.; PEHLER, K. and McCLURE, H. M. Immunogenicity and safety of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins in non-human primates. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 119: p. 84-91, 2000.
- BANNON, M. J. BCG and tuberculosis. **Arch. Dis. Child.**, v. 80: p. 80-3, 1999.
- BEAN, A. G. D. et al. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-target mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is compensated for by lymphotoxin. **J. immunol.**, v. 162: p. 3504-11, 1999.]
- BAROUCH, D. et al. Control of viremia and prevention of clinical AIDS in Rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. **Science**, v.290: p.486-92, 2000.

- BEHAR, S. M. et al. Susceptibility of mice deficient on CD1D or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Exp. Med.**, v. 189: p. 1973-80, 1999.
- BEHR, M. A. et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. **Science**, v. 284: p. 1520-8, 1999.
- BERMUDEZ, L. E. Production of transforming growth factor- β by *Mycobacterium avium*-infected human macrophages is associated with unresponsiveness to IFN- γ . **J. Immunol.**, v. 150: p. 1838-45, 1993.
- BIRD, A. P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. **Nature**, v. 321, p. 209-13, 1986.
- BOESEN, H. B ; JENSEN, N. ; WILEKE, T. and ANDERSEN, P. Human T –cell reponses to secreted antigen fractions of *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, v. 63 : p. 1491-7, 1995.
- BONATO, V.L.D. et al. Immune regulatory effect of pHSP65 DNA therapy in pulmonary tuberculosis: activation of CD8+ cells, interferon- γ recovery and reduction of lung injury. **Immunology**, v.113, p.130-8, 2004.
- BONATO, V. L. D. et al. Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. **Infect. Immun.**, v.66: p.169-75, 1998.
- BLOOM, B. R. et al. New strategies for leprosis and tuberculosis and for development of bacillus Calmette-Guerin into a multivaccine vechicle. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 569: p. 155-73, 1989.
- BOOM, W. H. et al. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. **Tuberculosis**, v. 83: p. 98-103, 2003.
- BOSIO, C. M; GARDNER, D. and ELKINS, K. L. Infection of B cell-deficient mice with CDC 1551, a clinical isolate of *Mycobacterium tuberculosis*: delay in dissemination and development of lung pathology. **J. Immunol.**, v. 164: p. 6417-25, 2000.
- BRANDT, L. et al. The protective effect of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine is increased by coadministration with the *Mycobacterium tuberculosis* 72-kDa fusion polyprotein Mtb72F in *M. tuberculosis*-infected guinea pigs. **Infect. Immun.** v.72: p. 6622–32, 2004.
- BRANDT, L. et al. Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. **Infect Immun.**, v.70: p.672–678, 2002.
- BRANDT, L. et al. ESAT-6 subunit vaccination against *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, v. 68(2): p. 791-5, 2000.
- BRANDT, L.; OETTINGER, T.; HOLM, A.; ANDERSEN, A. B. and ANDERSEN, P. Key epitopes on the ESAT-6 antigen recognized in mice during the recall of protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Immunol.**, v. 157: p. 3527-33, 1996.
- BREWER, J. M. et al. Aluminum hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4 or IL-13-mediated signaling. **J. Immunol.**, v.163: p.6448-54, 1999.
- BRITTON, W. J. and PALENDIRA, U. Improving vaccines against tuberculosis. **Immunol. Cell Biol.** v.81(1): p.34-45, 2003.
- BROOKES, R. H. et al. CD8+ T cell-mediated suppression of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* growth in activated human macrophages. **Eur. J. Immunol.**, v. 33: p. 3293-302, 2003.

- BROWN, M. C. and TAFFET, S. M. Lipoarabinomannans derived from different strains of *Mycobacterium tuberculosis* differentially stimulate the activation of NK-kB and KBF1 in murine macrophages. **Infect. Immun.**, v. 63: p. 1960-68, 1995.
- BUDDLE, B. M. et al. Influence of sensitization to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. **Vaccine**, v.20: p.1126-33, 2002.
- CARUSO, A. et al. Mice deficient in CD4+ T cells have only transiently diminished levels of IFN- γ , yet succumb to tuberculosis. **J. Immunol.**, v. 162: p. 5407-16, 1999.
- CHADBAN, S. I. et al. Interleukin-10 differentially modulates MHC class II expression by mesangial cells and macrophages in vitro and in vivo. **Immunology**, v. 94: p. 72-80, 1998.
- CHACKERIAN, A. and BEHAR, S. M. Susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis*: lessons from inbred strains of mice. **Tuberculosis** v.83(5): p.279-85, 2003.
- CHACKERIAN, A.; ALT, J.; PERERA, V. and BEHAR, S. M. Activation of NKT cells protects mice from tuberculosis. **Infect. Immun.**, v. 70(11): p. 6302-9, 2002.
- CHATTERJEE, D. and KHOO, K. H. Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. **Glycobiology**, v. 8(2): p. 113-20, 1998.
- CHU, R. S., et al. CpG Oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper (Th1) immunity. **J. Exp. Med.**, v. 186 (10): p. 1623-31, 1997.
- CHUNG, K. T. and BIGGERS, C. J. Albert Léon Charles Calmette (1863–1933) and the Antituberculous BCG Vaccination. **Perspect. Biol. Med.**, v. 44(3): p. 379-89, 2001
- CLEMENS, D. L. A and HORWITZ, M. A. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. **J. Exp. Med.**, v. 181: p. 2243-47, 1993.
- COLDITZ, G. A. et al. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis : Meta- analysis of the published literature. **JAMA**, v. 271 : p. 698-702, 1994
- COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, 393: 537-544, 1998.
- COLER, R. N. et al. Molecular cloning and immunologic reactivity of a novel low molecular mass antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Immunol.**, v. 161: p. 2356-64, 1998.
- COOPER, A. M. et al. Transient loss of resistance to pulmonary tuberculosis in p47(phox^{-/-}) mice. **Infect. Immun.**, v. 68: p. 1231-34, 2000.
- COOPER, A. M. et al. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Exp. Med.**, v. 186: p. 39-45, 1997.
- COOPER, A. M. et al. The course of *Mycobacterium tuberculosis* infection in the lungs of mice lacking expression of either perforin or granzyme mediated cytolytic mechanisms. **Infect. Immun.**, v.65: p. 1317-20, 1997b.
- COOPER, A. M. et al. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. **J. Exp. Med.**, v. 178: p. 2243-7, 1993.
- COSMA, C. L. et al. Superinfecting micobacteria home to established tuberculous granulomas. **Nat. Immunol.**, v. 5: p. 828-35, 2004.
- DALTON, D. K. Et al. Interferon- γ eliminates responding CD4 T cells during mycobacterial infection by inducing apoptosis of activated CD4 T Cells. **J. Exp. Med.**, v. 192(1): p. 117-22, 2000.
- DANNENBERG, A.M. Immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. **Hosp. Pract.**, v. 28: p. 51-8, 1993.

- De WAAL MALEFYT, R.; YSSEL, H. and de VRIES, J. E. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells: specific inhibition of IL-2 production and proliferation. **J. Immunol.** v.150: p.4754-61, 1993.
- De WAAL MALEFYT et al. Interleukin-10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. **J. Exp. Med.** v.174: p.915-22, 1991.
- De WAAL MALEFYT et al. Interleukin-10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J. Exp. Med.** v.174: p.1209-16, 1991b.
- DIELI, F. et al. Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular *Mycobacterium tuberculosis* by Vgamma9/delta2 T lymphocytes. **J. Exp. Med.**, v. 184: p. 1082-5, 2001.
- DIETHICH, J. et al. Exchanging ESAT-6 with TB10.4 in an Ag85B fusion molecule-based tuberculosis subunit vaccine: efficient protection and ESAT-6- based sensitive monitoring of vaccine efficacy. **J. Immunol.**, v. 174: p.6332-9, 2005.
- DOHERTY, T. M. and ANDERSEN, P. Vaccines for tuberculosis: novel concepts and recent progress. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.18(4): p.687-702, 2005.
- DOHERTY, T.M.; OLSEN, A.W.; PINXTEREN, L. and ANDERSEN, P. Oral vaccination with subunit vaccines protects animals against aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, v. 70(6): p. 3111-21, 2002.
- DRENNAN, M. B. et al. Toll-like Receptor 2-Deficient mice succumb to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Am. J. Pathol.**, v. 164: p. 49-57, 2004
- DYE, C. et al. Consensus statement. Global Burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country. **WHO Global surveillance and Monitoring Project. JAMA**, v. 282: p. 677-86, 1999.
- EHLERS, S. et al. $\alpha\beta$ T Cell-receptor-positive Cells and Interferon- γ , but not Inducible Nitric Oxide Synthase, are critical for granuloma necrosis in a mouse model of mycobacteria-induced pulmonary immunopathology. **J. Exp. Med.**, v. 194(12): p. 1847-59, 2001.
- EHLERS, M. W. and DAFPE, M. Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and host cells: are mycobacterial sugars the key? **Trends Microbiol.**, v. 6: p. 328-35, 1998.
- ERNST, J. D. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, v. 66: p. 1277-81, 1998.
- ERUSLANOV, E. B. et al. Lung cell responses to *M. tuberculosis* in genetically susceptible and resistant mice following intratracheal challenge. **Clin Exp Immunol.** v.135(1): p.19-28, 2004.
- FELDMANN, M. and MAINI, R. N. Anti-TNF therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? **Annu. Rev. Immunol.**, v. 19: p. 163-96, 2001.
- FENG, C. G. et al. Maintenance of pulmonary Th1 effector function in chronic tuberculosis requires persistent IL-12 production. **J. Immunol.**, v. 174: p. 4185-92, 2005.
- FENG, C. G. et al. Priming by DNA immunization augments protective efficacy of *Mycobacterium bovis* bacilli Calmette-Guerin against tuberculosis. **Infect. Immun.**, v. 69: p. 4174-6, 2001.
- FENG, C. G. et al. Increase in γ interferon-secreting CD8+, as well as CD4+, T cells in lungs following aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, v. 67: p. 3980-8, 1999.
- FINE, P. E. M. et al. Issues relating to the use of BCG immunization programs. **WHO Global surveillance and Monitoring Project**, 1999.

- FIORENTINO, D. F. et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **J. Immunol.**, v. 146: p. 3444-50, 1991.
- FLESCH, I. E.; HESS, J. H.; OSWALD, I. P.; KAUFMANN, S. H. Growth inhibition of *Mycobacterium bovis* by IFN- γ stimulated macrophages: regulation by endogenous tumor necrosis factor- α and by IL-10. **Int. Immunol.**, v. 6: p. 693, 1994.
- FLORIDO, M. et al. Gamma Interferon-induced T-Cell loss in virulent *Mycobacterium avium* infection. **Infect. Immun.**, v. 73(6): p. 3577-86, 2005.
- FLYN, J. L. and CHAN, J. What's good for the host is good for the bug. **TRENDS Microbiol.**, v. 13(3): p. 98-102, 2005.
- FLYNN, J. L. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. **Tuberculosis**, v. 84: p. 93-101, 2004.
- FLYN, J. L. and CHAN, J. Immunology of Tuberculosis. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 19: p. 93-129, 2001.
- FLYNN, J. L. et al. IL-12 increases resistance of BALB/c mice to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J. Immunol.**, v. 155: p. 2515-24, 1995.
- FLYNN, J. L. et al. Tumor necrosis factor alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **Immunity**, v.2: p.561-72, 1995b.
- FLYNN, J. L. et al. An essential role for IFN- γ in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Exp. Med.*, v. 178: p. 2249-54, 1993.
- FLYNN, J. L. et al. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **PNAS**, v. 89: p. 12013-17, 1992.
- FONSECA, D. P. et al. Induction of cell-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis* using DNA vaccines encoding cytotoxic and helper T-cell epitopes of the 38-kilodalton protein. **Infect. Immun.**, v.69(8): p.4839-45, 2001.
- GELUK, A. et al. Identification of major epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B that are recognized by HLA-A*0201-restricted CD81 T cells in HLA-transgenic mice and humans. **J. Immunol.**, v. 165: p. 6463-71, 2000.
- GINSBERG, A. M. What's new in tuberculosis vaccines? **Bull. Who** v.80: p.483-8, 2002.
- GIRI, P.K.; SABLE, S.B.; VERMA, I. and KHULLER, G.K. Comparative evaluation of intranasal and subcutaneous route of immunization for development of mucosal vaccine against experimental tuberculosis. **FEMS**, v. 45(1): p. 87-93, 2005.
- GORDON, S. V. et al. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. **Mol. Microbiol.**, v. 32: p. 643-9, 1999.
- GRANGE, J. M. et al. What is BCG? **Tubercle** v.64: p.129-39, 1983.
- GRIFFIN, J. P. and ORME, I. M. Evolution of CD4 T-cell subsets following infection of naive and memory immune mice with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.** V. 62: p. 1683-90, 1994.
- GRODE, L. et al. Efficacious vaccination against tuberculosis by *Mycobacterium bovis* bacilli Calmette-Guérin mutants that secrete listeriolysin. **J. Clin. Invest.**, v. 115: p. 2472-9, 2005.
- GURUNATHAN, S., KLINMAN, D. M. and SEDER, R. A. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. **Ann. Rev. Immunol.**, v.18: p.927-974, 2000.
- HAILE, M. et al. Nasal boost with adjuvanted heat-killed BCG or arabinomannan-protein improves primary BCG-induced protection in C57BL/6 mice. **Tuberculosis**, v. 85(1-2): p. 107-14, 2005.

HARTMANN, G. et al. Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN- α induction in plasmacytoid dendritic cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 33: p.1633–41, 2003.

HARTMANN G., et al. Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. **J Immunol**, v. 164: p. 1617–24, 2000.

HAVLIR, D. V. et al. Selective expansion of human gamma delta T cells by monocytes infected with live *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Invest.**, v. 87(2): p. 729-33, 1991.

HENDERSON, R. A.; WATKINS, S. C.; FLYNN, J. L. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Immunol.**, v. 159: p. 365-43, 1997.

HERNANDEZ-PANDO, R. et al. Pulmonary tuberculosis in BALB/c mice with non-functional IL-4 genes; changes in the inflammatory effects of TNF- α in the regulation of fibrosis. **Eur. J. Immunol.**, v. 34: p. 174-83, 2004.

HERNANDEZ-PANDO, R. et al. Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte. **Infect. Immun.**, v. 65: p. 3317-27, 1997a.

HERNANDEZ-PANDO, R. et al. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 α , tumor necrosis factor- α and transforming growth factor- β , during the course of experimental pulmonary tuberculosis. **Immunology**, v.90: p.607-17, 1997b.

HERNANDEZ-PANDO, R. AND ROOK, G. A. W. The role of TNF- α in T cell-mediated inflammation depends on the Th1/Th2 cytokine balance. **Immunology** v.82: p.591-5, 1994.

HESS, J. and KAUFMANN, S. H. E. Development of novel tuberculosis vaccines. **C. R. Acad. Sci. Paris**, v. 322: p. 953-8, 1999.

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

HOGARTH, P. J. et al. Evaluation of adjuvants for protein vaccines against tuberculosis in guinea pigs. **Vaccine**, v. 21: p. 977-82, 2003.

HOLTEN-ANDERSEN, L. et al. Combination of the cationic surfactant dimethyl dioctadecyl ammonium bromide and synthetic mycobacterial cord factor as an efficient adjuvant for tuberculosis subunit vaccines. **Infect. Immun.**, v.72: p.1608-17, 2004.

HOLT, J. G. et al. The mycobacteria. In: **Bergey's manual of determinative bacteriology**, 9th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, p. 597-603, 1994.

HONDALUS, M.K. et al. Attenuation of and protection induced by a leucine auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.** v.68: p.2888–98, 2000.

HORWTIZ, M. A. Et al. Enhancing the protective efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against tuberculosis by boosting with the *Mycobacterium tuberculosis* major secretory protein. **Infect. Immun.**, v. 73(8): p. 4676-83, 2005.

HORWITZ, M. A. and HARTH, G. A new vaccine against tuberculosis affords greater survival after challenge than the current vaccine in the guinea pig model of pulmonary tuberculosis. **Infect. Immun.** v.71: p.1672–9, 2003.

HORWITZ, M. A. et al. Recombinant bacillus calmette-guerin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. **PNAS** v.97: p.13853–8, 2000.

HOVAV, A. H.; FISHMAN, Y.; BERCOVIER, H. Gamma Interferon and monophosphoryl lipid A-trehalose dicorynomycolate are efficient adjuvants for *Mycobacterium tuberculosis* multivalent acellular vaccine. **Infect. Immun.**, v. 73(1): p. 250-7, 2005.

- HOVAV, A. et al. The *Mycobacterium tuberculosis* recombinant 27-kilodalton lipoprotein induces a strong Th1-type immune response deleterious to protection. **Infect. Immun.**, v. 71(6): p. 3146-54, 2003.
- HSIEH, M. J.; JUNQUEIRA-KIPINIS, A. P.; HOEFFER, A.; TURNER, O. C. and ORME, I. A. Incorporation of CpG oligodeoxynucleotide fails to enhance the protective efficacy of a subunit vaccine against *Mycobacterium tuberculosis*. **Vaccine**, v. 22(5-6): p. 655-9, 2004.
- HUARD, R. C. et al. The *Mycobacterium tuberculosis* complex-restricted gene CFP32 encodes an expressed protein that is detectable in tuberculosis patients and is positively correlated with pulmonary Interleukin-10. **Infect. Immun.**, v. 71(12): p. 6871-83, 2003.
- HUBBARD, R. D.; FLORY, C. M. and COLLINS, A. Immunization of mice with mycobacterial culture filtrate proteins. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 87: p. 94-98, 1992.
- HUCKRIEDE, A. et al. Influenza virosomes in vaccine development. **Methods Enzymol.**, v.373: p.74-91, 2003.
- HUYGEN, K. et al. Immunogenicity and protective efficacy for a tuberculosis DNA vaccine. **Nat. Med.**, v. 2: p. 893-8, 1996.
- JACKSON, M. et al. Persistence and protective efficacy of a *Mycobacterium tuberculosis* auxotroph vaccine. **Infect. Immun.** v.67: p.2867-73, 1999.
- JOHNSON, C. M.; COOPER, A. M.; FRANK, A.; BONORINO, C. B.; WYSOKI, L. J. and ORME, I. M. *Mycobacterium tuberculosis* aerogenic rechallenge infections in B cell-deficient mice. **Tuberc. Lung Dis.**, v. 78: p. 257-63, 1997.
- JUNQUEIRA-KIPINIS, A. P. et al. NK cells respond to pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*, but play a minimal role in protection. **J. Immunol.**, v. 171(11), 2003.
- KAMATH, A. B., et al. Cytotoxic CD8+ T Cells recognizing CFP10 are recruited to the lung after *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J. Exp. Med.**, p.1-11, 2004.
- KAMATH, A. T.; FENG, C. G.; MACDONALD, M.; BRISCOE, H. and BRITTON, W. J. Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect Immun.**, v. 67(4): p. 1702-7, 1999.
- KARAKOUSIS, P. C.; BISHAI, W. R. and DORMAN, S. E. *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune response. **Cell. Microbiol.**, v. 6(2): p. 105-18, 2004.
- KAUFMANN, S. H. E. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. **TRENDS in Immunology**, v.26(12): p.660-7, 2005.
- KAUFMANN, S. H. E. Immune response to tuberculosis: experimental animal models. **Tuberculosis**, v. 83: 107-11, 2003.
- KAUFMANN, S. H. E. and SCHAIBLE, U. E. A Dangerous Liaison between Two Major Killers: *Mycobacterium tuberculosis* and HIV Target Dendritic Cells through DC-SIGN. **J. Exp. Med.**, v. 197(1): p. 1-5, 2003.
- KAWAKAMI, K. et al. Minimal contribution of V α 14 Natural Killer T cells to Th1 responses and host resistance against mycobacterial infection in mice. **Microbiol. Immunol.**, v. 46(3): p. 207-10, 2002.
- KLINMAN, D. M. et al. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. **Immunological Reviews**, v.199: p.201-16, 2001.
- KRIEG, A. M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. **Annu. Rev. Immunol.** v.20: p.709-60, 2002.
- KRIEG, A.M.; Yi, A. K. and HARTMANN, G. Mechanisms and therapeutic application of immune stimulatory CpG DNA. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 84: p. 113-20, 1999.

- LADEL, C. H.; SZALAY, G.; REDEL, D.; KAUFMANN, S. H. E. Interleukin-12 secretion by *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. **Infect. Immun.**, v. 65: p. 1936-8, 1997a.
- LADEL, CH, et al. Lethal tuberculosis in Interleukin-6 deficient mutant mice. **Infect. Immun.**, v. 65: p. 4843-9, 1997b.
- LALVANI, A. et al. Enumeration of T cells specific for RD1-encoded antigens suggests a high prevalence of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in healthy urban Indians. **J. Infect. Dis.**, v. 183: p. 469-75, 2001.
- LALVANI, A. et al. Human cytolytic and interferon- γ -secreting CD8+ T lymphocytes specific of *Mycobacterium tuberculosis*. **PNAS**, v. 95: p. 270-9, 1998.
- LANGERMANS, J. A. M. et al. Protection of macaques against *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. **Vaccine**, v. 23: p. 2740-50, 2005.
- LEFFORD, M. J.; MCGREGOR, D. D. and MACKANESS, G. B. Transfer of adoptive immunity to tuberculosis in mice. **Infect. Immun.**, v. 11: p. 1174-81, 1975.
- LEWINSOHN, D. M. et al. Human purified protein derivative-specific CD4+ T cells use both CD95-dependent and CD95-independent cytolytic mechanisms. **J. Immunol.**, v. 160: p. 2374-79, 1998.
- LIENHARDT, C et al. Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity in vivo. **Eur. J. Immunol.** v.32: p.1605-13, 2002.
- LINDBLAD, E. B. et al. Adjuvant modulation of immune responses to tuberculosis subunit vaccines. **Infect. Immun.**, v. 65(2): p. 623-29, 1997.
- LINGNAU, K. et al. Poly-L-arginine synergizes with oligodeoxynucleotides containing CpG-motifs (CpG-ODN) for enhanced and prolonged immune responses and prevents the CpG-ODN-induced systemic release of pro-inflammatory cytokines. **Vaccine**, v.20: p.3498-3508, 2002.
- LOWRIE, D. B. et al. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination., v.400: p.269-71, 1999.
- LOZES, E. et al. Immunogenicity and efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding the components of secreted antigen 85 complex. **Vaccine**, v. 15: p. 830-3, 1997.
- LUO, X. D. et al. A study of the protective effect of the DNA vaccine encoding tubercle antigen 85B with MPT64 in mice challenged with *Mycobacterium tuberculosis*. **Chin. J. Tuberc. Respir. Dis.**, v.27: p.611-6, 2004.
- LYADOVA, I. V., et al. Intranasal BCG vaccination protects BALB/c mice against virulent *Mycobacterium bovis* and accelerates production of IFN- γ in their lungs. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 126: p. 274-9, 2001.
- LYADOVA, I. V. et al. An ex vivo study of T lymphocytes recovered from the lungs of I/St mice infected with and susceptible to *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect Immun.** v.66(10): p.4981-8, 1998.
- LYM, J.H. et al. Identification of the new T-cell-stimulation antigens from *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate. **FEMS**, v. 232: p. 51-9, 2004.
- MAHAIRAS, G. G.; SABO, P. J.; HICKEY, M. J.; SINGH, D. C. and STOVER, C. K. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. **J. Bacteriol.**, v. 178: p. 1274-81, 1996.
- MAJLESSI, L. et al. Influence of ESAT-6 secretion system 1 (RD1) of *Mycobacterium tuberculosis* on the interaction between mycobacteria and the host immune system. **J. Immunol.**, v. 174: p. 3570-9, 2005

- MALEFYT, W. et al. Interleukin-10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. **J. Exp. Med.**, v. 174: p. 915-21, 1991a.
- MALEFYT, W.; YSSEL, H. and VRIE, J. E. Direct effects of IL-10 on subsets on human CD4⁺ T cell clones and resting T cells: specific inhibition of IL-2 production and proliferation. **J. Immunol.**, v. 150: p. 4754-60, 1993.
- MALEFYT, W. et al. Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J. Exp. Med.**, v. 174: p. 1209-15, 1991b.
- MALIK, Z. A.; IYER, S. S. and KUSNER, D. J. *Mycobacterium tuberculosis* phagosomes exhibit calmodulin-dependent signal transduction: contribution of inhibition of phagosome-lysosome fusion and intracellular survival in human macrophages. **J. Immunol.**, v. 166: p. 3392-401, 2001.
- MALIK, Z. A.; DENNING, G. M. and KUSNER, D. J. Inhibition of Ca²⁺ signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increase survival within human macrophages. **J. Exp. Med.**, v. 191: p. 287-302, 2000.
- MANICKAN, E. et al. Genetic immunization against herpes simplex virus. **J. Immunol.**, v.155: p.259-65, 1995.
- MARSHALL, J. D. et al. Identification of a novel CpG DNA class and motif that optimally stimulate B cell and plasmacytoid dendritic cell functions. **J. Leukoc. Biol.**, v.73: p. 781–92, 2003.
- MARTIN, C. The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG? **Eur Respir J.** v.26(1): p.162-7, 2005.
- MATTNER, F. et al. Vaccination with poly-L-arginine as immunostimulant for peptide vaccines: induction of potent and long-lasting T-cell responses against cancer antigens. **Cancer Res.**, v. 62: p.1477-80, 2002.
- McDONOUGH, K. A. and KRESS, Y. Cytotoxicity for lung epithelial cells is a virulence associated phenotype of *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect Immun**, v.63: p.4802–11, 1995.
- McKINNEY, J.D. et al. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. **Nature**, v. 406: p. 435-8, 2000.
- McSHANE, H. et al. Boosting BCG with MVA85A: the first candidate subunit vaccine for tuberculosis in clinical trials. **Tuberculosis**, v. 85: p. 47-52, 2005.
- McSHANE, H. et al. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. **Nat. Med.**, v. 10: p. 1240-4, 2004.
- MEANS, T. K. et al. Human Toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Immunol.**, v. 163: p. 3920-27, 1999.
- MOHAN, V. P. et al. Effects of tumor-necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. **Infect. Immun.**, v. 69: p. 1947-55, 2001.
- MOREIN, B. et al. ISCOM: a delivery system for neonates and for mucosal administration. **Adv. Vet. Med.**, v.41: p.405-13, 1999.
- MOREIRA, A. L. et al. Mycobacterial antigens exacerbate disease manifestations in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. **Infect. Immun.**, v. 70(4): p. 2100-7, 2002.
- MOREIRA, A. L. et al. Aerosol infection of mice with recombinant BCG secreting murine IFN- γ partially reconstitutes local protective immunity. **Microb. Pathog.**, v. 29: p. 175-85, 2000.

- MURRAY, P. and YOUNG R. A. Increased antimycobacterial immunity in interleukin-10 deficient mice. **Infect. Immun.**, v. 67(6): p. 3087-95, 1999.
- NAU, G. J. et al. A chemoattractant cytokine associated with granulomas in tuberculosis and silicosis. **PNAS**, v. 94: p. 6414-19, 1997.
- NIKONENKO, B. V. et al. Comparative analysis of mycobacterial infections in susceptible I/St and resistant A/Sn inbred mice. **Tuber. Lung Dis.** v.80(1): p.15-25, 2000.
- NOLTE, F. S. and METCHOCK, B. Mycobacterium. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C. and YOLKEN, F. H. (ed) **Manual of clinical microbiology**, v. 164: p. 3476-9, 2000.
- NORTH, R. J.; LACOURSE, R. and RYAN, L. Vaccinated mice remain more susceptible to *Mycobacterium tuberculosis* infection initiated via the respiratory route than via the intravenous route. **Infect Immun.** v.67(4): p.2010-2, 1999.
- NORTH, R. J. Mice incapable of making IL-4 or IL-10 display normal resistance to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin Exp Immunol.** v.113(1): p.55-8, 1998.
- NORTH, R. J. *Mycobacterium tuberculosis* is strikingly more virulent for mice when given via the respiratory than via the intravenous route. **J Infect Dis.** v.172: p.1550–1553, 1995.
- NORTH, R. J. T cell dependence of macrophage activation and mobilization during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, v.10: p.66-71, 1974.
- ODDO, M. et al. Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Immunol.**, v. 160: p. 5448-54, 1998.
- O'DONNELL, M. A. The genetic reconstruction of BCG as a new immunotherapeutic toll. **Trends Microbiol.**, v. 15: p. 512-7, 1997.
- OLSEN, A. W. et al. Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. **Infect. Immun.**, v. 69(5): p. 2773-8, 2001.
- ORME, I. M. Current progress in tuberculosis vaccine development. **Vaccine**, v. 23: p. 2105-8, 2005.
- ORME, I.M. The use of animal models to guide rational vaccine design. **Microbes Infect.**, v.7(5-6): p.905-10, 2005.
- ORME, I. M. The mouse as a useful model of tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 83: p. 112-15, 2003.
- ORME, I. M. et al. T lymphocytes mediating protection and cellular cytolysis during the course of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Evidence for different kinetics and recognition of a wide spectrum of protein antigens. **J. Immunol.**, v. 148: p. 189-96, 1992.
- ORME, I. M. Induction of nonspecific acquired resistance and delayed-type hypersensitivity, but not specific acquired resistance in mice inoculated with killed mycobacterial vaccines. **Infect. Immun.**, v.56: p.3310, 1988.
- OTTENHOF, T. H.; KUMARARATNE, D. and CASANOVA, J. L. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-1cytokines in immunity to intracellular bacteria. **Immunol. Today**, v. 19: p. 491-4, 1998.
- PAL., P. G. & HORWITZ, M. A. Immunization with extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis* induces cell-mediated immune responses and substantial protective immunity in guinea pig model of pulmonary tuberculosis. **Infect. Immun.**, v. 60: p. 4781-92, 1992.
- PEARL, J. E. et al. Inflammation and Lymphocyte activation during mycobacterial infection in the interferon- γ deficient mouse. **Cel Immunol.**, v. 211: p. 43-50, 2001.
- PODDA, A. and DEL GIUDICE, G. MF59-adjuvanted vaccines: increased immunogenicity with an optimal safety profile. **Expert Rev. Vaccines**, v.2: p.197-203, 2003.

- PEPPOLONI, S. et al. Mutants of the Escherichia coli heat-labile enterotoxin as safe and strong adjuvants for intranasal delivery of vaccines. **Expert Rev. Vaccines**, v.2: p.285-293, 2003.
- PUGIN, J. et al. CD14 is a pattern recognition receptor. **Immunity**, v. 6: p. 609-16, 1994.
- PYM, A. S. et al. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. **Nat Med** v.9: p.533–539, 2003.
- PYM, A. A.; BRODIN, P.; BROSCHE, R.; HUERRE, M. and COLE, S. T. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. **Mol. Microbiol.**, v. 46: p. 709-11, 2002.
- QUESNIAUX, V. et al. Toll-like receptor pathways in the immune responses to Mycobacteria. **Microbes Infect.**, v. 6: p. 946-59, 2004.
- RAVN, P.A. et al. Human T cell response to the ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Infect. Dis.**, v.179: p.637-45, 1999.
- REED, S. and LOBET, Y. Tuberculosis vaccine development: from mouse to man. **Microbes and Infect.**, v. 7: p. 922-31, 2005.
- REED, S. G. et al. Prospects for a better vaccine against tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 83(1-3): p.213-9, 2003.
- RHOADES, E. R. et al. Chemokine response in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, v. 63: p. 3871-7, 1995.
- ROBERTS, A. D. et al. Characteristics of protective immunity engendered by vaccination of mice with purified culture filtrate protein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. **Immunol.**, v. 85: p. 502-7, 1995.
- ROJAS, R. E.; BALAJI, A.; SUBRAMANIAN, A. and BOOM, W. H. Regulation of human CD4+ $\alpha\beta$ T-cell-receptor positive (TCR+) and $\gamma\delta$ TCR+ T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* by IL-10 and transforming growth factor β . **Infect. Immun.**, v. 67: p. 6461-7, 1999.
- ROOK, G. A. W.; DHEDA, K. and ZUMLA, A. Do successful tuberculosis vaccines need to be immunoregulatory rather than merely Th1-boosting? **Vaccine**, v. 23: p. 2115-20, 2005.
- ROOK, G. A. W.; DHEDA, K. and ZUMLA, A. Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5: p. 661-7, 2005b.
- ROOK, G. A. W.; HERNANDEZ-PANDO, R.; DHEDA, K. and SEAH, G.T. IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. **TRENDS Immunol.**, v. 25(9): p. 483-8, 2004.
- ROOK, G. A. W. The pathogenesis of tuberculosis. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 50: p. 259-84, 1996.
- ROSENKRANDS, I. et al. Identification and characterization of a 29-kilodalton protein from *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate recognized by mouse memory effector cells. **Infect. Immun.**, v. 66: p. 2728-35, 1998.
- RYLEY, R. L. et al. Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis. A two-year study of contagion in a tuberculosis ward. **Amer. J. Hyg.**, v. 70: p. 185-96, 1959
- SABLE, S. B.; VERMA, I. and KHULLER, G. K. Multicomponent antituberculous subunit vaccine based on immunodominant antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. **Vaccine**, v. 23: p. 4175-84, 2005.
- SALGAME, P. Host innate Th1 response and bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 17: p. 374-80, 2005.

- SAMBANDAMURTHY, V. K. et al. A pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* is highly attenuated and protects mice against tuberculosis. **Nat. Med.** v.8: p.1171–4, 2002.
- SAMPSON, S. L. et al. Protection elicited by a double leucine and pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* in guinea pigs. **Infect. Immun.**, v. 72(5), p. 3031-7, 2004.
- SANTOSUOSSO, M. et al. Mechanisms of mucosal and parenteral tuberculosis vaccinations: adenoviral-based mucosal immunization preferentially elicits sustained accumulation of immune protective CD4 and CD8 cells within the airway lumen. **J. Immunol.**, v. 174: p. 7986-94, 2005.
- SAUNDERS, B. M. et al. Transmembrane TNF is sufficient to initiate cell migration and granuloma formation and provide acute, but no long-term, control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J. Immunol.**, v. 174: p. 4852-9, 2005.
- SAUNDERS, B. M.; FRANK, A. A.; ORME, I. M. and COOPER, A. M. CD4 is required for the development of a protective granulomatous response to pulmonary tuberculosis. **Cell. Immunol.**, v. 215: p. 65-72, 2002.
- SCANGA, C. A. et al. Depletion of CD4+ T cells causes reactivation of murine persistent despite continued expression of interferon- γ and nitric oxide synthase 2. **J. Exp. Med.**, v. 192: p. 347-358, 2000.
- SCHULLER-LEVIS, G. B. et al. Mycobacterial lipoarabinomannan induces nitric oxide and tumor necrosis factor alpha production in a macrophage cell line: down regulation by taurine chloramine. **Infect Immun.**, v. 62: p. 4671-74, 1994.
- SEAH, G. T.; SCOTT, G. M. and ROOK, G. A. Type 2 cytokine gene activation and its relationship to extent of disease in patients with tuberculosis. **J. Infect. Dis.** v.181: p.385-9, 2000.
- SELWYN, P. A. et al. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. **New Engl. J. Med.**, v. 320: 545-50, 1989.
- SERBINA, N. V. et al. CD8+ CTL from lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice express perforin in vivo and lyse infected macrophages. **J. Immunol.**, v. 165: p. 353-63, 2000.
- kama, H. et al. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* peptide that is recognized by human CD4+ and CD8+ T cells in the Context of Multiple HLA alleles. **J. Immunol.**, v. 173: p. 1966-77, 2004.
- SKEIKY, Y. A. et al. Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. **J. Immunol.** v.172: p.7618–28, 2004.
- SILVA, C. L. et al. Cytotoxic T cells and mycobacteria. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 197: p. 11-18, 2001.
- SILVA, C. L. et al. Characterization of the memory/activated T cells that mediate the long-lived host response against tuberculosis after bacillus Calmette-Guérin or DNA vaccination. **Immunol.**, v.97: p.573-81, 1999.
- SILVER, R. F.; WALLIS, R. S. and ELLNER, J. J. Mapping T cell epitopes of the 30-kDa α antigen of *Mycobacterium bovis* strains bacillus Calmette-Guerin in purified protein derivative (PPD)-positive individuals. **J. Immunol.**, v. 154: 4665-74, 1995.
- SINGH, G.; SINGH, B.; TRAJKOVIC, V. and SHARMA, P. *Mycobacterium tuberculosis* 6kDa secreted antigenic target stimulates activation of J774 macrophages. **Immunol. Letters**, v. 98: p. 180-8, 2005.

- SMITH, S. M. et al. Decreased IFN-gamma and increased IL-4 production by human CD8⁺ T cells in response to *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculosis patients. **Tuberculosis** v.82: p.7-13, 2002.
- SMITH, D. A. et al. Characterization of auxotrophic mutants of *Mycobacterium tuberculosis* and their potential as vaccine candidates. **Infect. Immun.** v.69: p.1142–50, 2001.
- SMITH, S.M. et al. Human CD8⁺ T Cells Specific for *Mycobacterium tuberculosis* secreted antigens in tuberculosis patients and healthy BCG-vaccinated controls in the Gambia. **Infect. Immun.**, v. 68 (12): p. 7144-8, 2000.
- SMITH, D. W. Protective effect of BCG in experimental tuberculosis. **Adv. Tuberc. Res.**, v.22:p.1-97, 1985.
- SONNENBERG, M. G. and BELISLE, J.T. Definition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: N terminal amino acid sequencing and electrospray mass spectrometry. **Infect. Immun.**, v. 65: p. 4515-24, 1997.
- SOUSA, A. O. et al. Relative contributions of distinct MHC class I-dependent cell populations in protection to tuberculosis infection in mice. **PNAS**, v. 97: p. 4204-08, 1999.
- STENGER, S. et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. **Science**, v. 282: p. 121-25, 1998.
- STENGER, S. and MODLIN, R. L. Control of *Mycobacterium tuberculosis* through mammalian toll-like receptors. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 14: p. 452-57, 2002.
- STRAKE, J. R. and CONNELLY, K. K. Bacille Calmette-Guerin vaccine. In: Plotkin SA, Mortimer RA, editors. **Vaccines**. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, p. 463, 1994.
- TAILLEUX, L. et al. DC-SIGN is the Major *Mycobacterium tuberculosis* Receptor on Human Dendritic Cells. **J. Exp. Med.**, v. 197(1): p. 121-7, 2003.
- TASCON, R. E. et al. Immunostimulatory bacterial DNA sequences activate dendritic cells and promote priming and differentiation of CD8⁺ T cells. **Immunol.**, v. 99: p. 1-7, 2000.
- TIBERIO, L. et al. Host factors impacting the innate response in humans to the candidate adjuvants RC529 and monophosphoryl lipid A. **Vaccine**, v.22: p.1515-23, 2004.
- TSENOVA, L. et al. Anti-tuberculosis vaccine evaluation using a rabbit model. **TB Vaccines for the World**, Montreal, Canada, September 17–19, 2003.
- TSUKAGUCHI, K. ET AL. CD4⁺ alpha-beta and gamma-delta T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*: similarities and differences in antigen recognition cytotoxic effector function and cytokine production. **J. Immunol.**, v. 154: p. 1786-96, 1995.
- TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3: p. 133-45, 2003.
- TURNER, J. et al. In vivo IL-10 production reactivates chronic pulmonary tuberculosis in C57BL/6 mice. **J. Immunol.**, v. 169: p. 6343-51, 2002.
- VAN CREVEL, R. Increased production of interleukin 4 by CD4⁺ and CD8⁺ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities. **J. Infect. Dis.** v.181: p.1194-1197, 2000.
- VERTHELYI, D. et al. Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CpG motifs. **J. Immunol.**, v. 166: p. 2372–7, 2001.
- VORDERMEIER, H. M.; VENKATAPRASAD, N.; HARRIS, D. P. and IVANYI, J. Increase of tuberculous infection in the organs of B cell-deficient mice. **Clin. Exp. Med.**, v. 106: p. 312-9, 1996.
- VON REYN, C. F. & VUOLA, J. M. New vaccines for the prevention of tuberculosis. **Vaccine**, v. 35: p. 465-474, 2002.

- WANG, R. et al. Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in human by a malaria DNA vaccine. **Science**, v.282: p.476-80, 1998.
- WANGOO, A. et al. Contribution of Th1 and Th2 cells to protection and pathology in experimental models of granulomatous lung disease. **J. Immunol.** v.166: p.3432-9, 2001.
- WAKEHAM, J.; WANG, J. and XING, Z. Genetically determined disparate innate and adaptive cell-mediated immune responses to pulmonary *Mycobacterium bovis* BCG infection in C57BL/6 and BALB/c mice. **Infect Immun.** v.68(12): p.6946-53, 2000.
- WELDINGH, K., HANSEN, A., JACOBSEN, S. and ANDERSEN, P. High Resolution Electroelution of polyacrylamide gels for the purification of single proteins from *Mycobacterium tuberculosis* Culture Filtrate. **Scand. J. Immunol.**, v. 51: p. 79-86, 2000.
- WELDINGH, K. and ANDERSEN, P. Immunological evaluation of novel *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins. **FEMS**, v. 23: p. 159-64, 1999.
- WELDINGH, K. et al. Two-dimensional electrophoresis for analysis of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate and purification and characterization of six novel proteins. **Infect. Immun.**, v. 66: p. 3492-500, 1998.
- WEDLOCK, D. N. et al. Vaccination of cattle with a CpG oligodeoxynucleotide-formulated mycobacterial protein vaccine and *Mycobacterium bovis* BCG induces levels of protection against bovine tuberculosis superior to those induced by vaccination with BCG alone. **Infect. Immun.**, v.73(6): p.3540-6, 2005.
- WILLIAMS, A. et al. Evaluation of vaccines in the EU TB Vaccine Cluster using a guinea pig aerosol infection model of tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 85: p. 29-38, 2005.
- YEREMEEV, V. V. et al. The 19-kDa antigen and protective immunity in a murine model of tuberculosis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 120: p. 274-9, 2000.
- YOUNG, D. B. et al. Mycobacterial protein antigens: a compilation. **Mol. Microbiol.**, v. 6: p. 133-45, 1992.
- ZHU, D.; JIANG, S. and LUO, X. Therapeutic effects of Ag85B and MPT64 DNA vaccines in a murine model of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Vaccine**, v. 23: p. 4619-24, 2005.

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](#)