

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

**EFEITO IMUNOESTIMULADOR DA VACINA DNA-hsp65  
SOBRE MACRÓFAGOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS  
HUMANAS**

**LUÍS HENRIQUE FRANCO**

**Ribeirão Preto  
- 2005 -**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**LUÍS HENRIQUE FRANCO**

**EFEITO IMUNOESTIMULADOR DA VACINA DNA-hsp65  
SOBRE MACRÓFAGOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS  
HUMANAS**

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

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. VÂNIA LUIZA DEPERON BONATO**

**RIBEIRÃO PRETO  
- 2005 -**

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

Franco, Luís Henrique

Efeito imunoestimulador da vacina DNA-hsp65 sobre macrófagos e células dendríticas humanas. Ribeirão Preto, 2005.

Nº de páginas : 100 il; 30 cm

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

Orientadora: Bonato, Vânia Luiza Deperon.

1. Macrófagos e células dendríticas humanas – DNA-hsp65

*“Há quem diga que todas as noites são de sonhos.  
Mas há também quem garanta que nem todas, só as  
de verão. No fundo, isso não tem importância. O que  
interessa mesmo não é a noite em si, são os sonhos.*

*Sonhos que o homem sonha sempre, em todos os  
lugares, em todas as épocas do ano, dormindo ou  
acordado”*

*Shakespeare, Sonhos de Uma Noite de Verão*

*Dedico este trabalho aos meus pais  
Luís e Vera ...*

*... e à minha orientadora  
Profa. Vânia*

## AGRADECIMENTOS

- A **Deus** por todas as belas oportunidades que tenho, pela minha saúde, e acima de tudo, pelos verdadeiros amigos e a família maravilhosa que ganhei ao ingressar na jornada da vida. Sem eles, este trabalho não existiria.

- Aos meus pais **Luís** e **Vera**, que sempre depositaram em mim a confiança necessária, sempre torceram pelo meu sucesso e me apoiaram em tudo que necessitei. É muito confortante poder contar com a ajuda e a palavra de vocês quando eu preciso. Mais um passo foi dado, e sem vocês a realização deste trabalho não teria sentido. Obrigado também aos meus irmãos **Elaine** e **Júlio**. À minha **Vó Zina** e à **Tia Nilda**, por também me apoiarem em todos os momentos, por terem me criado e colaborado com minha educação, e por fazerem parte da minha vida.

- À minha orientadora **Profa. Vânia**. Acho que nem preciso dizer o quanto evoluí como pesquisador neste laboratório. Obrigado pela sua paciência de ensinar. Meu empenho não valeria nada sem seu esforço. Sinto-me muito honrado por ter sido seu primeiro aluno.

- Aos professores **Dr. Célio Lopes Silva**, **Dra. Arlete A. M. Coelho-Castelo**, **Dra. Constance Oliver** e **Dra. Maria Célia Jamur** tanto pela ajuda intelectual quanto por cederem espaços nos seus laboratórios para a realização de alguns ensaios.

- À **Profa. Alexandrina Sartori** por ter contribuído muito na minha formação e por ter sido meu elo de ligação com a Vânia (!!). Ao **Prof. Sílvio Luiz de Oliveira** por ter me iniciado na pesquisa e me ensinado a gostar de Imunologia.

- Aos **Professores do Curso de Pós Graduação** em Imunologia Básica e Aplicada por transmitirem com dedicação seus conhecimentos, que muito contribuíram para minha formação.

- Aos membros da banca **Dra. Beatriz Rossetti** e **Dr. Momtchilo Russo**.

- À **Aninha**, por sempre me ajudar com seus conhecimentos de química e por colaborar na preparação das suspensões de micobactérias (pelas risadas também) e por outras coisas mais... Obrigado à **Iza** por toda sua ajuda e atenção dispensados a mim durante a realização do meu trabalho. À **Áurea** e à **Valna**, da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto pela preparação das bolsas de concentrado de leucócitos. À **Alexandra** pela aquisição das minhas células no citômetro. Ao **Thiago** pelo suporte técnico na obtenção da vacina de DNA. À **Sheila** e à **Lúcia** pela lavagem e esterilização dos materiais utilizados no meu trabalho.

- À **Glauce** pela ajuda valiosa na padronização das culturas de células e pelas dicas ao longo destes 2 anos. À **Ana Paula Trombone** pela ajuda nos experimentos de microscopia e de RT-PCR (e também por assistir aos meus seminários!!).

- Aos meus companheiros de laboratório: **Eduardo** (meu melhor amigo), **Rubinho** (meu amigo também), **Denise** (minha melhor amiga também), **Marina**, **Pryscilla** e **Marininha** (minhas novas melhores amigas). Agradeço de verdade a cumplicidade e o companheirismo de vocês. Pry e Marina, queria destacar que vocês têm colaborado muito com meu crescimento, pessoal e profissional. Muitíssimo obrigado!

- Aos amigos do laboratório do Dr. Célio: **Deisson**, **Juliana**, **Karla**, **Patrícia**, **Rodrigo**, **Rogério**, **Sandra**, **Sílvia**, **Tatiana** e **Viviane**, que sempre estão prontos para me ajudar prontamente. Muito obrigado ao **Fábio Galletti** e à **Ana Olívia** que transmitiram conhecimentos valiosos sobre o cultivo de micobactérias.

- Aos companheiros de pós-graduação: **André**, **Luciana Ruas** e **Luiz Otávio**. Foi muito importante para mim ter cursado as disciplinas da pós com vocês. Valeu pela troca de experiências e conhecimentos.

- Aos pós-graduandos do laboratório do Prof. João Santana: **Gustavo Garlet** pelo apoio na realização do RT-PCR e à **Karen** por toda ajuda e atenção dispensadas a mim durante esse período. Muito obrigado pela simpatia e paciência de vocês. Karen, como você mesma diz, uma mão lava a outra. Estarei sempre aqui para te ajudar em qualquer coisa que precisar. Obrigado por sempre me receber de braços abertos!

- À **Alexandra Ivo** (Xan), minha nova co-orientadora (novinha em folha!) por sua hospitalidade e paciência. Eu te admiro muito e me espelho nas suas atitudes como profissional que é.

- A todos que trabalham e que trabalharam no **CPT**.

- Às secretárias **Ana e Rô**.

- Aos inesquecíveis amigos **Bauxita (Giovanna)**, **Ordi (Nilva)** e **Texugo (Lindsey)**, e aos amigos do peito **Daniel**, **Everton**, **John** e **Patrícia Beatriz** pela amizade verdadeira e por sempre estarem de braços abertos quando preciso. Vocês são verdadeiros irmãos para mim.

- À **FAPESP**, que através do Projeto de Auxílio à Pesquisa Individual (processo nº 02/13354-0), Projeto Temático (processo nº 00/09663-2) e Bolsa de Mestrado (processo nº 02/12272-0) permitiram a realização deste trabalho.

- Ao **CNPq** (Institutos do Milênio), à **Rede TB** e à **FAEPA** pelo apoio financeiro que também possibilitaram a realização deste trabalho.

# ÍNDICE

<b>Abreviaturas</b> -----	i
<b>Resumo</b> -----	iii
<b>Abstract</b> -----	vi
<b>Introdução</b> -----	1
1) Tuberculose: contexto geral-----	2
2) Interação de macrófagos com <i>M. tuberculosis</i> -----	4
3) Interação de células dendríticas com <i>M. tuberculosis</i> -----	7
4) Resposta imune específica anti-micobacteriana-----	10
5) Desenvolvimento de novas vacinas contra TB-----	13
<b>Objetivos</b> -----	19
<b>Material e Métodos</b> -----	21
1. Células-----	22
1.1 Obtenção de monócitos a partir de células mononucleares de sangue periférico-----	22
1.2 Obtenção de monócitos CD14 <sup>+</sup> com esferas magnéticas-----	22
1.3 Diferenciação de macrófagos a partir de monócitos-----	23
1.4 Diferenciação de células dendríticas a partir de monócitos-----	23
2. Obtenção da vacina DNA-hsp65 e do vetor pVAX-----	23
3. Análise do DNA plasmideal purificado-----	24
4. Proteínas de filtrado de cultura de <i>M. tuberculosis</i> -----	25
4.1 Oligodeoxinucleotídeos CpG (CpG-ODN)-----	25
5. Marcação da vacina de DNA com Alexa Fluor-----	25
6. Microscopia confocal para análise de TLR9 intracelular-----	25
7. Produção de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)-----	26
7.1 Relação dos clones de anticorpos utilizados no ELISA-----	27
8. Citometria de fluxo-----	27
8.1 Anticorpos monoclonais-----	27
8.2 Avaliação da morte celular por apoptose de macrófagos e células dendríticas após estimulação com DNA-hsp65 ou PFC-----	28
8.3 Avaliação do fenótipo de macrófagos e células dendríticas após estimulação com a vacina DNA-hsp65 ou PFC-----	28
9. Proliferação de linfócitos T e detecção de IFN- $\gamma$ e IL-5-----	29
10. Extração de RNA total de culturas de macrófagos e células dendríticas humanas-----	30
10.1 Eletroforese de amostras de RNA total em gel denaturante-----	30
11. Detecção de RNAm para a hsp-65 por RT-PCR-----	31
12. Obtenção de <i>M. tuberculosis</i> para infecção <i>in vitro</i> -----	32
13. Infecção <i>in vitro</i> de macrófagos e células dendríticas-----	32
14. Análise estatística-----	33
<b>Resultados</b> -----	34
1. Protocolo de obtenção de macrófagos e células dendríticas a partir de monócitos-----	35
2. Análise do DNA plasmideal purificado-----	37
3. Captura da vacina DNA-hsp65 em solução por macrófagos e células dendríticas humanas-----	40
4. Determinação da dose da vacina DNA-hsp65-----	42
5. Análise da expressão de TLR9 em macrófagos e células dendríticas humanas-----	45

6. Avaliação da indução de morte celular por apoptose após estimulação com DNA-hsp65 -----	48
7. Produção de citocinas e quimiocinas por macrófagos e células dendríticas estimulados com DNA-hsp65-----	49
8. Expressão de marcadores de ativação em macrófagos e células dendríticas estimulados com DNA-hsp65-----	52
9. Ativação de linfócitos T alogênêicos por macrófagos e células dendríticas previamente estimulados com DNA-hsp65 -----	55
10. Detecção do RNAm para hsp65 em macrófagos e células dendríticas humanas -----	60
11. Avaliação da indução de morte celular por apoptose após estimulação com PFC-----	61
12. Produção de citocinas e quimiocinas por macrófagos e células dendríticas estimulados com PFC -----	62
13. Expressão de marcadores de ativação em macrófagos e células dendríticas estimulados com PFC -----	66
14. Avaliação da capacidade microbicida de macrófagos e de células dendríticas estimulados ou não com DNA-hsp65-----	68
<b>Discussão</b> -----	70
<b>Conclusões</b> -----	83
<b>Bibliografia</b> -----	85

# *Abreviaturas*

---

## ABREVIATURAS

7AAD – 7-amino-actinomicina D	MCP-1 – proteína quimioatrativa de monócitos
ACD – ácido citrato dextrose	ME – mercapto-etanol
APC – célula apresentadora de antígenos	MHC – complexo principal de histocompatibilidade
BCG – bacilo de Calmette-Guérin	MIF – mediana da intensidade de fluorescência
CFSE - 5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl Ester	MIP – proteína inflamatória de macrófagos
CMSP – células mononucleares do sangue periférico	MLR – reação leucocitária mista
CpG – motivos ou seqüências de citosina-guanina não-metiladas	MR – receptor para manose
CR – receptor para o complemento	NF- $\kappa$ B – fator de transcrição kappa-B
CTL – linfócito T citolítico	NK – células exterminadoras naturais
FACS – citometria de fluxo	ODN – oligodeoxinucleotídeos
Fas-L – fas-ligante	PAMP – padrão molecular associado a patógenos
FcR – receptor para a porção constante de imunoglobulinas	PBS – solução fostato tamponada
GM-CSF – fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos	PCR – reação em cadeia da polimerase
HIV – vírus da imunodeficiência humana	PFC – proteínas de filtrado de cultura de <i>M. tuberculosis</i>
IFN- $\gamma$ – interferon gama	PRR – receptor de reconhecimento padrão
Ig – imunoglobulina	SEM – erro padrão da média
IL- interleucina	TAP – transportador associado ao processamento de antígenos
iNOS – enzima indutora da síntese de óxido nítrico	TB – tuberculose
IP-10 – proteína induzida por IFN- $\gamma$	TLR – receptor do tipo toll
LAM – lipoarabinomanana	TNF – fator de necrose tumoral
LPS – lipopolissacarídeo	UFC – unidades formadoras de colônia
mAb – anticorpo monoclonal	

# *Resumo*

---

## RESUMO

A vacina DNA-hsp65, construção pcDNA3-hsp65, na qual foi inserido o gene que codifica a proteína de choque térmico de 65 kDa (hsp65, do inglês *Heat Shock Protein 65 kDa*) de *Mycobacterium leprae* apresentou atividade profilática e terapêutica contra a tuberculose experimental. O vetor plasmideal usado na construção desta vacina (pcDNA3) não é liberado para uso clínico pelo fato de conter o gene que confere resistência à ampicilina. Uma nova construção vacinal foi desenvolvida clonando-se o gene da hsp65 no vetor pVAX (DNA-hsp65, construção pVAX-hsp65), que contém o gene de resistência à kanamicina, sendo liberado para ensaios clínicos. A vacina DNA-hsp65 (pVAX-hsp65) está sendo testada pelo nosso grupo, integrantes do Centro de Pesquisas em Tuberculose da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (CPT-FMRP-USP) em modelo animal, numa abordagem comparativa para testar sua eficácia protetora em relação à construção vacinal pcDNA3-hsp65. No presente trabalho, nosso objetivo constituiu em avaliar o potencial imunestimulatório da vacina DNA-hsp65 (pVAX-hsp65) sobre células humanas, mais especificamente sobre macrófagos e células dendríticas. Estas células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês *Antigen Presenting Cell*) exercem funções essenciais na ativação da resposta imune contra *M. tuberculosis*.

Nossos resultados mostraram que após 4 horas de estimulação com DNA-hsp65, tanto macrófagos quanto células dendríticas foram capazes de capturar a vacina de DNA. Ambas as populações celulares expressaram o RNAm para a hsp65, além de apresentarem elevada expressão constitutiva de TLR9 intracelular. Após 48 horas de estimulação, células dendríticas apresentaram regulação positiva na expressão dos receptores CD80 e CD86 e produziram concentrações significativas de IL-12. Em contrapartida, macrófagos não apresentaram alterações no fenótipo celular e nem secretaram IL-12. No entanto, foram capazes de produzir concentrações significativas de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10. Verificamos também que macrófagos estimulados com a vacina DNA-hsp65 foram mais eficientes em restringir o crescimento de *M. tuberculosis* após infecção *in vitro*, em relação às células dendríticas submetidas ao mesmo estímulo.

Em uma outra abordagem do nosso trabalho, analisamos também a capacidade imunestimulatória das proteínas do filtrado de cultura de

*Mycobacterium tuberculosis*, descritas como PFC, sobre macrófagos e células dendríticas. Essas proteínas são descritas como antígenos imunodominantes na tuberculose e também têm sido estudadas como alvos potenciais para o desenvolvimento de novas vacinas. Macrófagos estimulados com PFC secretaram níveis elevados de TNF- $\alpha$ , IL-6, e IL-10, e não secretaram IL-12, enquanto células dendríticas secretaram níveis elevados de IL-12 e IP-10. Quanto aos marcadores de superfície, macrófagos estimulados com PFC acrescidas de motivos CpG, apresentaram modulação positiva na expressão de CD86, enquanto células dendríticas estimuladas apenas com PFC também apresentaram aumento na expressão deste receptor.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram, pela primeira vez, que uma vacina de DNA, cujo efeito profilático e terapêutico descrito contra a TB experimental, foi capaz de ativar células apresentadora de antígenos humanas de modo distinto.

# *Abstract*

---

## ABSTRACT

The DNA vaccine (pcDNA3-hsp65) that codifies the 65 kDa heat shock protein (hsp65) from *Mycobacterium leprae* presented a prophylactic and a therapeutic effect against experimental tuberculosis. The plasmid pcDNA3 is not allowed to be used in clinical assays because it contains the resistance gene to ampicillin. A new construct was developed by cloning hsp65 gene into pVAX vector (DNA-hsp65, construct pVAX-hsp65), which contains the resistance gene to kanamycin and is allowed to clinical assays. In this work, our aim was to evaluate the immunostimulatory effect of DNA-hsp65 vaccine (pVAX-hsp65) over human macrophages and dendritic cells. These antigen presenting cells play an essential role in the immune response against micobacterial infections.

Our results showed that 4 hours after DNA-hsp65 stimulation, both macrophages or dendritic cells were able to uptake the DNA plasmid. Both antigen presenting cells expressed mRNA to hsp65 and high levels of intracellular constitutive TLR9. On one hand, after 48 hours of stimulation, dendritic cells upregulated CD80 and CD86 expression and secreted high levels of IL-12. On the other hand, macrophages did not present any changes in the cellular phenotype and did not secrete IL-12. However, they produced high levels of IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10. We have also showed that macrophages stimulated with DNA-hsp65 were able to restrict the growth of *Mycobacterium tuberculosis* after *in vitro* infection while dendritic cells were not able to control the bacterial load.

We also evaluated the immunostimulatory effect of other mycobacterial antigens: the proteins secreted by *M. tuberculosis* described as culture filtrate proteins (CFP). These proteins have been studied as tools for the development of new vaccines. Macrophages stimulated with CFP antigens secreted high levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10, and did not secrete IL-12. Dendritic cells secreted high levels of IL-12 and IP-10. When we analyzed the cellular phenotype, we observed that macrophages stimulated with CFP plus CpG-oligodeoxynucleotides upregulated the CD86 expression while dendritic cells stimulated with CFP only up regulated the expression of this receptor. These results show, for the first time, that a DNA vaccine which presented a prophylactic and a therapeutic effect against experimental tuberculosis, was able to activate in a different way human antigen presenting cells.

# *Introdução*

---

# INTRODUÇÃO

## 1) Tuberculose: contexto geral

A tuberculose (TB), doença causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, representa um grave problema de saúde pública dos países em desenvolvimento. A América Latina, a Ásia e a África detêm a maioria de casos de TB do mundo. O Brasil ocupa o 13º lugar dentre os 22 países que registram o maior número de casos de TB. Dados epidemiológicos mostram que ocorrem aproximadamente 10 milhões de novos casos e 3 milhões de mortes ao ano. Mais de 90.000 casos são notificados ao ano no Brasil, com uma incidência estimada em mais de 120.000 casos e mais de 6.000 mortes anuais. Fatores econômicos, sociais, desinformação, sistemas precários de vigilância sanitária, falhas na assistência aos doentes e desnutrição contribuem para a disseminação desta doença. Além disso, o uso indiscriminado de antibióticos, terapias inadequadas e o abandono de tratamento têm contribuído para o surgimento de bacilos resistentes a múltiplas drogas (The World Health Report, 2004).

*M. tuberculosis*, assim como outras micobactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* e *M. canetti*) são bacilos curvos ou retos, com 0,2 a 0,7 µm de largura por 1,0 a 10 µm de comprimento. Possuem grande quantidade de lipídeos em sua parede celular, o que confere a estas bactérias a propriedade tintorial de álcool-ácido resistência. São aeróbias e classificadas de acordo com o seu tempo de crescimento, sendo consideradas de crescimento rápido quando requerem menos de 7 dias para produzir colônias visíveis, e de crescimento lento, aquelas que produzem colônias visíveis após 7 dias de incubação em meios sólidos (Holt et al., 1994; Nolte & Metchock, 1995).

A infecção acomete principalmente as vias aéreas superiores, sendo o pulmão o órgão-alvo da manifestação clínica da doença. A transmissão da TB ocorre através da inalação de gotículas de saliva contendo o bacilo, eliminadas por indivíduos com infecção ativa ao tossir, falar ou espirrar (Riley et al., 1959). O estabelecimento da doença depende do número de bacilos inalados, da virulência da cepa, das condições imunológicas e características genéticas do indivíduo exposto (Dannenberg, 1989). A grande maioria dos indivíduos infectados apresenta

resistência natural à infecção, porém, cerca de 5 a 10% destas pessoas desenvolvem a doença pulmonar ativa durante a vida (Chackerian et al., 2001).

A resposta imune na TB inicia-se após a fagocitose dos bacilos pelos macrófagos alveolares (Hingley-Wilson et al., 2000) e células dendríticas (Herrmann & Lagrange, 2005). Após a fagocitose, seguindo-se a fusão do fagossoma ao lisossoma, os macrófagos liberam enzimas lisossomais, levando à degradação das micobactérias. As células dendríticas parecem não desempenhar função efetora na eliminação de bacilos, mas atuam eficientemente na apresentação de antígenos e ativação dos linfócitos T (Guermonprez et al., 2002). Quando infectados, macrófagos e células dendríticas podem secretar fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , do inglês *Tumor Necrosis Factor*) e interleucina-12 (IL-12), que ativa as células exterminadoras naturais (NK, do inglês *Natural Killer*). Uma vez ativadas, as células NK produzem interferon gama (IFN- $\gamma$ ), que juntamente com o TNF- $\alpha$ , potencializam os mecanismos microbicidas dos macrófagos, como a liberação de intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio, na tentativa de destruir os bacilos (Adams & Hamilton, 1992; Schlesinger, 1993).

A eliminação de *M. tuberculosis* pelos macrófagos pode não ser eficiente, e a persistência de bacilos no interior destas células, assim como a infecção de outros macrófagos teciduais e células dendríticas, estimula a secreção contínua de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6. Estes mediadores são responsáveis pelo recrutamento de leucócitos, incluindo linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> para o local da infecção (Kaufmann, 2002), promovendo a formação do granuloma, que tem a finalidade de delimitar o foco infeccioso e evitar sua disseminação. Esta estrutura é caracterizada pela presença central de macrófagos contendo bacilos fagocitados, que em eventos posteriores se diferenciam em células epitelióides e são circundados por um infiltrado de linfócitos. O granuloma permite que macrófagos e linfócitos T interajam, garantindo a cooperação intercelular necessária para a geração de uma resposta anti-micobacteriana efetiva (Revisado por Ehlers, 1999).

Ao interagirem com macrófagos infectados, linfócitos TCD4<sup>+</sup> secretam IFN- $\gamma$ , que por sua vez, aumenta o processo inflamatório e a atividade microbicida destas células da imunidade inata, enquanto linfócitos TCD8<sup>+</sup> lisam células infectadas (Boom et al., 2003). A ativação da imunidade específica também pode ser ineficiente para promover a eliminação dos bacilos nos indivíduos suscetíveis. Como

conseqüência, há uma migração exacerbada de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> e monócitos, caracterizando uma resposta de hipersensibilidade do tipo IV, com a presença de múltiplos granulomas e em determinados casos mais graves, necrose, fibrose e comprometimento pulmonar (Kaufmann et al., 2002).

## **2) Interação de macrófagos com *M. tuberculosis***

Os macrófagos alveolares são descritos como uma das primeiras células a serem infectadas por *M. tuberculosis* (Hingley-Wilson et al., 2002). A fagocitose da micobactéria por macrófagos humanos ou murinos ativa, através dos fatores de transcrição NF- $\kappa$ B (do inglês *Nuclear Factor-Kappa B*), IRF-3 ou IRF-7, a expressão de diversos genes, incluindo aqueles que codificam citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Ehrt et al., 2001; Ragno et al., 2001; Takeda & Akira, 2004). Portanto, a resposta imune inata inicial contra *M. tuberculosis* é marcada pela síntese de fatores inflamatórios, necessários para o recrutamento de leucócitos para o sítio da infecção.

Nos últimos anos, vários estudos vêm relatando a interação de macrófagos com *M. tuberculosis*. Em 2001, Bodnar et al. mostraram que macrófagos murinos derivados da medula óssea infectados por *M. tuberculosis* foram capazes de eliminar os bacilos intracelulares após serem ativados por lipopolissacarídeo (LPS) e IFN- $\gamma$ . Porém, a infecção com a micobactéria não resultou em modulação positiva na expressão de moléculas coestimulatórias ou de adesão. Não se observou também modulação positiva na expressão de moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) ou de CD86 em macrófagos murinos infectados por BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) (Jiao et al., 2002). Estudos realizados em macrófagos humanos derivados de monócitos mostraram que cepas de *M. tuberculosis* provenientes de isolados clínicos foram mais eficientes em estimular a secreção de TNF- $\alpha$  por estas células, em relação à cepa H37Rv (Hoal-Van Helden et al., 2001).

Nos últimos anos têm sido descritos diversos receptores de reconhecimento padrão (PRR, do inglês *Pattern Recognition Receptor*) expressos na superfície das células da imunidade inata, como macrófagos e células dendríticas. Estes receptores são responsáveis pelo reconhecimento de estruturas moleculares denominadas de

PAMPs (do inglês *Pathogen Associated Molecular Patterns*) cuja expressão é compartilhada por classes distintas de patógenos. Como exemplos de PAMPs podemos citar: RNA de dupla fita, DNA bacteriano, LPS, lipoarabinomanana (LAM) e diversos lipídeos e carboidratos complexos sintetizados por patógenos.

Vários receptores expressos na superfície dos macrófagos, inclusive alguns PRR, podem mediar a fagocitose dos bacilos. Entre estes receptores de superfície destacam-se os receptores para as porções constantes de imunoglobulinas (FcR) (Armstrong & Hart, 1975), os receptores para componentes do sistema complemento (Schlesinger et al., 1990; Hirsch et al., 1994), o receptor para manose (Schlesinger, 1993), os receptores para proteínas surfactantes (Downing et al., 1995) e o receptor CD14 (Pugin et al., 1994). Outra família de receptores, descritos como receptores do tipo toll (TLR, do inglês *Toll Like Receptors*), estão envolvidos no reconhecimento de micobactérias por macrófagos e células dendríticas, mediando a ativação destas células. Dois destes receptores, o TLR2 e TLR4, parecem desempenhar papel essencial na ativação de macrófagos por *M. tuberculosis*, uma vez que células CHO (do inglês *Chinese Hamster Ovary*) transfectadas com os genes que codificam TLR2 ou TLR4 foram ativadas por *M. tuberculosis in vitro*, enquanto células não transfectadas foram incapazes de serem ativadas pelo bacilo (Means et al., 1999). Porém, estudos *in vivo* utilizando animais deficientes para os genes que codificam TLR2 ou TLR4 resultaram em dados contraditórios quanto à participação destes receptores na imunidade contra *M. tuberculosis* (Reiling et al., 2002; Kamath et al., 2003).

Dependendo da interação molecular bacteriana e do receptor expresso na superfície celular, diferentes vias de sinalização e ativação podem ou não ser desencadeadas. A fagocitose de *M. tuberculosis* mediada pelo complemento desempenha um importante papel na patogenia da doença, uma vez que pode afetar a fusão do fagossoma com o lisossoma. O bacilo pode ser opsonizado por C3b e C3bi após a ativação da via alternativa do complemento, e interagir com os receptores do complemento (CR, do inglês *Complement Receptor*) CR1, CR3 e CR4. Dentre estes receptores, é descrito que o CR3, também denominado Mac-1, é o principal envolvido na fagocitose da micobactéria opsonizada (Schlesinger et al., 1990). Quando isso acontece, a ativação da explosão da cadeia respiratória e a maturação do fagossoma são inibidas (Malik et al., 2000; Malik et al., 2001). Por outro lado, a entrada de *M. tuberculosis* opsonizado por IgG via FcR induz a

produção de intermediários reativos do oxigênio, e permite a fusão do fagossoma com o lisossoma (Armstrong & Hart, 1975).

O receptor para manose também pode reconhecer e mediar a internalização de cepas virulentas de *M. tuberculosis*. Um dos ligantes bem caracterizados para esse receptor é o LAM (Schlesinger et al., 1994), abundantemente expresso na superfície micobacteriana. Além disso, os receptores para manose podem mediar a liberação de LAM para compartimentos endocíticos que contém CD1b, molécula não polimórfica envolvida na apresentação de antígenos não protéicos, facilitando a apresentação de antígenos derivados de ácidos micólicos e lipoglicanas para células T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (Prigozy et al., 1997). Recentemente, foi descrito que a internalização de *M. tuberculosis*, mediada pelo TLR2 ou TLR4, induz a síntese de IL-12 (Heldwein & Fenton, 2002), enquanto a internalização via receptor para manose estimula a secreção de IL-10 e inibe a de IL-12 (Kaufmann & Schaible, 2003). Estes dados sugerem que a produção de citocinas por células da imunidade inata, após a interação com *M. tuberculosis*, pode direcionar o padrão de resposta dos linfócitos T, estimulando sua ativação ou inibição.

O CD14, outro PRR, é uma proteína de membrana conhecida e caracterizada como o receptor de alta afinidade para LPS de bactérias gram-negativas. Porém, o CD14 pode também se ligar ao LAM de *M. tuberculosis*, induzindo macrófagos a secretarem IL-8, uma quimiocina importante que participa no recrutamento de neutrófilos (Pugin et al., 1994).

A molécula de adesão CD44 também pode estar envolvida na captura de *M. tuberculosis* por macrófagos. Leemans et al. (2003) demonstraram que macrófagos peritoneais de camundongos deficientes de CD44 secretaram níveis significativamente menores de TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$  (proteína inflamatória de macrófagos) e IFN- $\gamma$ , em relação a macrófagos de animais selvagens, e capturaram quantidades significativamente menores de *M. tuberculosis*, sugerindo que esta molécula participa da fagocitose do bacilo e da ativação celular.

Portanto, o tipo de resposta imune gerada pelo macrófago depende principalmente do receptor utilizado pela micobactéria para interagir com esta célula. A conseqüência deste contato (bacilo-macrófago) deverá influenciar no balanço da síntese de citocinas pró-inflamatórias e de citocinas que atuam na regulação da resposta imune específica, contribuindo ou não para um perfil de resposta eficaz no controle da infecção.

### 3) Interação de células dendríticas com *M. tuberculosis*

Além do papel protetor conferido às funções efetoras dos macrófagos ativadas, linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> na TB humana e experimental, muitos estudos vêm enfatizando a importância das células dendríticas nesta infecção. Estas APCs de ampla motilidade atuam como sentinelas do sistema imune, e são originadas a partir de precursores CD34<sup>+</sup> provenientes da medula óssea. Nos tecidos periféricos, estes precursores originam as células dendríticas imaturas, que incluem as células de Langerhans, as células dendríticas intersticiais e as células dendríticas dermais (Banchereau et al., 1998). A característica principal das células dendríticas reflete-se em sua capacidade de promover intensa ativação de linfócitos T virgens, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Tal propriedade associa-se à expressão constitutiva de moléculas de classe I e de classe II do MHC, e de moléculas coestimulatórias e de adesão em elevados níveis, quando comparados à expressão em macrófagos e linfócitos B (Guermonprez et al., 2002).

Morfologicamente, estas células também são bem diferenciadas quando comparadas aos demais tipos celulares que compõem o sistema imune, pelo fato de apresentarem uma série de projeções delgadas de membrana, descritas como dendritos. Os dendritos aumentam a área de contato entre as células dendríticas e os linfócitos T. Desta forma, um maior número de linfócitos com diferentes especificidades podem ser ativados pelas células dendríticas, quando comparado ao número de células T que interagem com os macrófagos ou com os linfócitos B.

Quanto à distribuição, as células dendríticas podem ser encontradas em pequenas proporções tanto nos órgãos linfóides como nos órgãos não linfóides, sendo a localização relacionada à sua função. Deste modo, as células dendríticas caracterizadas como imaturas situam-se nos órgãos não linfóides, sendo descritas na pele, pulmões, coração, intestino (Banchereau et al., 1998; Guermonprez et al., 2002), e são especializadas na captura de antígenos. Em presença de estímulo, perdem sua capacidade de capturar os antígenos, iniciando seu processo de maturação, que é acompanhado de mudanças fenotípicas e funcionais. Essas alterações resultam na migração das células dendríticas ativadas para os órgãos linfóides secundários regionais (Guermonprez et al., 2002). Durante o processo de maturação, as células dendríticas regulam positivamente a expressão de moléculas do MHC, moléculas coestimulatórias e de adesão, além de sintetizarem IL-12. Dessa

forma, células dendríticas maduras são potentes APCs, capazes de ativar linfócitos T virgens e iniciar respostas imunes adaptativas (Banchereau et al., 1998; Guermonprez et al., 2002). Diversos estímulos promovem a maturação das CDs, entre eles, alguns PAMPs. Os PAMPs tipo I, como proteoglicanos e lipoproteínas, estimulam as CDs a secretarem IL-12, direcionando a ativação da resposta imune específica celular mediada por IFN- $\gamma$  (Kapsenberg, 2003). Os PAMPs tipo II, caracterizados principalmente como glicoproteínas de parasitas e alérgenos de diferentes origens, em conjunto com mediadores solúveis como a prostaglandina E2 ou a histamina, estimulam as CDs a secretarem IL-4, contribuindo para a diferenciação de uma resposta imune humoral (Kapsenberg, 2003).

De acordo com evidências experimentais recentes, sugere-se que as células dendríticas ativadas poderiam contribuir para a diferenciação dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> em Th1 ou Th2 (Kalinski et al., 1999). Estas sub-populações de linfócitos TCD4<sup>+</sup> são caracterizadas pelo padrão distinto de citocinas que secretam (Mosmann et al., 1986). A IL-12, cujo receptor é expresso na superfície de linfócitos T ativados, estimula a diferenciação de linfócitos para o padrão Th1. Linfócitos Th1 secretam IFN- $\gamma$ , responsável pela ativação de respostas imunes celulares, mediadas principalmente por macrófagos ativados. Os linfócitos Th2, por sua vez, secretam IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10. Estas citocinas são responsáveis pela ativação de respostas imunes humorais. Portanto, estímulos que induzem a secreção de IL-12 por células dendríticas, como os PAMPs tipo I, contribuiriam para a geração de respostas de padrão Th1.

Recentemente, foi descrito que as células dendríticas podem ser originadas de 2 precursores distintos: um de origem mielóide e o outro de origem linfóide (Pulendran et al., 1999; Shortman & Liu, 2002). As células dendríticas mielóides humanas têm a capacidade de produzir altos níveis de IL-12 e induzir resposta Th1, enquanto as células dendríticas linfóides induzem uma resposta Th2, por produzirem baixas concentrações de IL-12 (Rissoan et al., 1999). Embora este seja um estudo pioneiro, não existem evidências de que isto ocorra *in vivo*. Além disso, na diferenciação de linfócitos T de camundongos, as células dendríticas parecem agir de modo oposto às células dendríticas humanas, ou seja, células dendríticas linfóides parecem induzir a diferenciação de linfócitos Th1, enquanto as células dendríticas mielóides estimulariam a diferenciação de linfócitos Th2 (Pulendran et al., 1999).

Além de atuarem na diferenciação dos linfócitos T, as células dendríticas também podem fagocitar células em apoptose, resultando na apresentação de antígenos aos linfócitos TCD8<sup>+</sup> (Larsson et al., 2001; Iyoda et al., 2002). Este mecanismo foi descrito como apresentação cruzada pelo fato de antígenos extracelulares, quando internalizados, estimularem a ativação de linfócitos TCD8<sup>+</sup> citotóxicos. Vale ressaltar que os macrófagos atuam de modo distinto. Quando eles fagocitam células apoptóticas, suprimem a resposta imune celular, inclusive as respostas induzidas pelas células dendríticas e a resposta inflamatória, através da produção de TGF- $\beta$  (do inglês *Transforming Growth Factor-beta*), IL-10 e IL-13 (Larsson et al., 2001).

Vários trabalhos descreveram a interação das micobactérias com as células dendríticas. A infecção *in vitro* de células dendríticas obtidas dos pulmões de camundongos com *M. tuberculosis* induziu a maturação destas células, caracterizada pela regulação positiva na expressão de receptores de superfície como CD80, CD86, CD54 e MHC de classe II, pela produção de IL-12 e pela capacidade de ativar linfócitos T virgens a produzir IFN- $\gamma$  (Gonzalez-Juarrero & Orme, 2001). Foi demonstrado também que células dendríticas humanas derivadas de monócitos foram capazes de internalizar *M. tuberculosis* e modularam positivamente a expressão das moléculas CD80, CD40, CD54 e molécula de classe I do MHC após a infecção, além de secretarem níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias (Henderson et al., 1997). Geijtenbeek et al. (2003) relataram que a infecção de células dendríticas humanas imaturas com BCG, resultou em regulação positiva na expressão da molécula de classe II do MHC e das moléculas CD80, CD86 e CD83. Outros autores também descreveram que não somente o BCG, mas também *M. tuberculosis* foi capaz de induzir a maturação de células dendríticas humanas, caracterizada pelo aumento na expressão de moléculas coestimulatórias e síntese de citocinas pró-inflamatórias (Thurnher et al., 1997; Demangel et al., 1999; Tsuji et al., 2000).

Com o intuito de comparar a interação de macrófagos e células dendríticas com *M. tuberculosis*, Bodnar et al. (2001) descreveram que *M. tuberculosis* multiplicou-se de modo similar dentro de macrófagos e células dendríticas imaturas derivadas da medula óssea *in vitro*. A ativação destas células com LPS e IFN- $\gamma$  inibiu o crescimento dos bacilos, por uma via dependente de óxido nítrico. No entanto,

somente os macrófagos ativados apresentaram a capacidade de matar *M. tuberculosis*, enquanto as células dendríticas, através da sua função de APC, poderiam servir como um reservatório de bacilos nos tecidos com a finalidade de ativar os linfócitos.

Nos últimos dois anos vem surgindo grande interesse sobre o tipo de PAMP, constituinte da micobactéria, que interage com determinado PRR expresso na superfície de células dendríticas. Esse tipo de interação pode influenciar a ativação ou a inibição de uma resposta imune inata eficiente em direcionar uma resposta imune específica protetora na TB. A interação de LAM, constituinte da parede das micobactérias, com os receptores TLR2 e TLR4 estimula a secreção de IL-12 por células dendríticas (Heldwein & Fenton, 2002). Por outro lado, a interação de LAM com o receptor DC-SIGN (do inglês *DC-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin binding receptor*) ou com o receptor para manose, expressos na superfície de células dendríticas, induz a secreção de altos níveis de IL-10 e inibe a secreção de IL-12, prejudicando a geração de respostas imunes celulares (Geitenbeek et al., 2003; Kaufmann & Schaible, 2003; Herrmann & Lagrange, 2005).

Desse modo, como descrevemos anteriormente para macrófagos, a interação das células dendríticas com *M. tuberculosis* requer ainda uma melhor compreensão no sentido de avaliar o resultado do balanço da interação de diferentes PRR com PAMPs na ativação ou supressão de uma resposta imune específica.

#### **4) Resposta imune específica anti-micobacteriana**

Uma vez que *M. tuberculosis* desenvolveu diversos mecanismos que permitem sua sobrevivência no interior dos macrófagos (Bermudez et al., 1993; Russel et al., 1996), freqüentemente, a ativação inicial destas células nos indivíduos suscetíveis, decorrente da presença dos bacilos, é insuficiente para eliminá-los completamente. O controle da infecção requer a ativação da resposta imune celular específica, mediada principalmente por linfócitos T.

Estudos em humanos e em modelos animais demonstraram a participação de diferentes populações de células T na imunidade específica ao *M. tuberculosis* (Leveton et al., 1989; Barnes et al., 1991; Orme, 1993). Os linfócitos TCD4<sup>+</sup> são de grande importância na indução de 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 complexados às moléculas de classe II do MHC e na ativação desta população de linfócitos. Estudos de transferência adotiva demonstraram que linfócitos TCD4<sup>+</sup> foram capazes de transferir proteção contra *M. tuberculosis* (Orme & Collins, 1983). Animais deficientes da molécula de classe II do MHC, infectados por *M. tuberculosis*, morreram após aproximadamente 30 dias de infecção (Caruso et al., 1999). Em humanos, o papel protetor dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> na TB pôde ser demonstrado em indivíduos co-infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e por *M. tuberculosis*. Esses indivíduos apresentam a diminuição no número e função efetora dos linfócitos TCD4<sup>+</sup>, o que contribui para a progressão da infecção, reativação de *M. tuberculosis* endógeno e elevada suscetibilidade à re-infecção (Barnes et al., 1991).

Linfócitos TCD4<sup>+</sup> humanos, após serem ativados por antígenos micobacterianos, secretam IFN- $\gamma$  e também promovem a lise de macrófagos infectados por *M. tuberculosis*. Para exercerem a função citolítica (CTL), linfócitos TCD4<sup>+</sup> expressam granzimas, Fas-L (CD95L), granzimas e perforinas. Além disso, células TCD4<sup>+</sup> contribuem com as células TCD8<sup>+</sup> e T  $\gamma\delta$  através da secreção de IL-2, que estimula a proliferação destas células. Todas estas funções das células TCD4<sup>+</sup> são importantes na imunidade protetora, mas podem ser expressas diferencialmente durante os estágios da infecção (Revisado por Boom et al., 2003).

A importância da subpopulação de linfócitos TCD8<sup>+</sup> nas infecções micobacterianas foi demonstrada em modelos experimentais nos quais animais deficientes em  $\beta$ 2 microglobulina, na molécula TAP (do inglês *Transporter Associated with Antigen Processing*), em CD8 $\alpha$ , em moléculas de classe I do MHC ou em perforina foram todos mais suscetíveis à infecção com *M. tuberculosis* que os animais selvagens (Flynn et al., 1992; Behar et al., 1999; Cooper et al., 1997a; Sousa et al., 1999).

Linfócitos TCD8<sup>+</sup> específicos, ao serem ativados por antígenos micobacterianos, também secretam IFN- $\gamma$ , porém em níveis menores que células TCD4<sup>+</sup> (Canaday et al., 1999). A resposta imune de linfócitos TCD8<sup>+</sup> envolve a lise de células infectadas através da expressão de perforinas, granzimas, Fas-ligante e granzimas (Revisado por Stenger, 2001). Ao serem secretadas, as perforinas se polimerizam na membrana da célula alvo, levando à formação de poros. As

granulinas, por sua vez, penetram por estes poros e, no interior da célula infectada, podem induzir a ativação de caspases, estimulando a morte celular por apoptose, ou eliminarem diretamente as micobactérias presentes no interior da célula alvo (Stenger et al., 1998; Silva et al., 2001). Além disso, os poros de membrana formados pelas perforinas induzem um desequilíbrio osmótico na célula infectada, ocasionando a morte celular por necrose. O Fas-L (CD95L), expresso por linfócitos TCD8<sup>+</sup>, ao se ligar ao Fas na superfície das células alvo infectadas, induz também a morte celular por apoptose (Revisado por Stenger, 2001).

Em relação às citocinas associadas com proteção na TB, vários trabalhos descreveram que aquelas que ativam respostas mediadas por células, ou seja, que se enquadram no perfil Th1, contribuem para restringir a infecção. Um exemplo disto são os animais deficientes da produção de IFN- $\gamma$ , os quais foram incapazes de inibir o crescimento de *M. tuberculosis* nos pulmões e em outros órgãos (Cooper et al., 1993; Flynn et al., 1993). Isto indica que o papel protetor das células TCD4<sup>+</sup>, e provavelmente das células TCD8<sup>+</sup>, é dependente da sua habilidade em sintetizar e secretar esta citocina, que por sua vez, ativa os mecanismos microbicidas dos macrófagos nos sítios de infecção. Animais deficientes na produção de IFN- $\gamma$ , quando infectados com BCG transfectado com o gene que codifica IFN- $\gamma$ , apresentaram número menor de bactérias nos pulmões, granulomas mais delimitados e elevada expressão de iNOS (enzima indutora da síntese de óxido nítrico), comparados aos animais que foram infectados por BCG transfectado com vetor (Moreira et al., 2000). Clinicamente, pacientes que apresentam defeitos totais ou parciais no receptor de IFN- $\gamma$  são altamente suscetíveis a infecções com bactéria intracelular, incluindo micobactérias ambientais como *M. avium* e *M. smegmatis*, ou infecções disseminadas por *M. bovis*. Da mesma forma, pacientes deficientes do receptor da IL-12 são suscetíveis a tais infecções (Revisado por Ottenhoff et al., 1998). Ainda nesse contexto, camundongos deficientes de IL-12 são incapazes de induzir uma resposta imune eficaz para o controle da infecção (Cooper et al., 1997b), uma vez que na ausência desta citocina a geração de uma resposta imune celular eficaz, com a síntese de IFN- $\gamma$ , torna-se comprometida.

Além do IFN- $\gamma$  e da IL-12, o TNF- $\alpha$  também desempenha papel protetor na TB. Esta citocina pode atuar de modo sinérgico com o IFN- $\gamma$  na ativação de macrófagos, além de ser um potente mediador pró-inflamatório e atuar no

recrutamento de leucócitos para os locais de infecção. Nesse sentido, a função relevante do TNF- $\alpha$  é sua participação na formação do granuloma. Animais deficientes no gene que codifica o TNF- $\alpha$  não conseguiram formar granulomas organizados e apresentaram áreas de extensa necrose. A incapacidade de formação de granulomas bem delimitados favoreceu a disseminação de *M. tuberculosis* e a morte precoce dos animais (Bean et al., 1999).

Diante do que foi descrito acima, uma compreensão abrangente da regulação da resposta imune durante a infecção natural por *M. tuberculosis* poderá, certamente, auxiliar no desenvolvimento de estratégias, como novas vacinas e terapias, que permitam intervir na resposta imune contra *M. tuberculosis*.

## **5) Desenvolvimento de novas vacinas contra TB**

O desenvolvimento de uma cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* virulenta, que provoca a TB bovina, por Calmette e Guérin no Instituto Pasteur em 1921, representou a descoberta de uma vacina contra a TB humana, usada desde 1948 (Bloom et al., 1989). Esta vacina, popularmente conhecida como BCG (Bacilo de Calmette-Guérin), apresenta uma série de vantagens. Como imunógeno, estimula memória imunológica de longa duração, variando de 5 a 50 anos, com uma dose única de administração. Além disso, a administração de doses adicionais (reforço) e a administração como vacina oral também não apresentam contra-indicações. 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 (O'Donnell, 1997). Por outro lado, enquanto a vacina BCG é capaz de induzir imunidade protetora em crianças, principalmente em relação à TB meningeal, esta vacina não induz proteção contra TB pulmonar em indivíduos adultos.

A vacina BCG é classificada como uma vacina de primeira geração, ou seja, uma vacina viva atenuada. Isso garante que *M. bovis* se multiplique no interior dos macrófagos, fornecendo antígenos para o sistema imune por tempos prolongados e garantindo uma memória imunológica duradoura. Porém, estudos em diferentes populações demonstraram que a vacina BCG apresenta uma eficácia de proteção que varia de 0 a 80% (Colditz et al., 1994). Uma das explicações possíveis para esta ampla variação de proteção seria a exposição prévia do indivíduo a micobactérias ambientais. Isso geraria uma resposta imune capaz de inibir a replicação *in vivo* do

BCG e, portanto, poderia comprometer a indução de proteção (Fine, 1989; Brandt et al., 2002). Outra explicação seria a geração de cepas de BCG com genótipos e fenótipos distintos daqueles da cepa original devido às diferenças na manipulação da vacina por diversos laboratórios do mundo (Lagranderie et al., 1996). Outros fatores, como métodos de estocagem da vacina ou a idade de vacinação também podem estar envolvidos na eficácia protetora (Fine, 1995).

Diante dessa eficácia variável, grupos de pesquisas em diferentes países têm concentrado seus esforços no desenvolvimento de novas vacinas contra a TB. As primeiras estratégias visavam o desenvolvimento de vacinas obtidas a partir de microrganismos mortos. Apesar de induzirem memória imunológica de longa duração, as vacinas de microrganismos mortos não induziam respostas protetoras em relação às vacinas atenuadas (Smith, 1985).

Nos últimos anos, vários estudos vêm sendo realizados com o propósito de caracterizar os antígenos de *M. tuberculosis* que são capazes de induzir pelo menos proteção parcial contra TB em modelos animais. Uma ampla variedade de preparações antigênicas obtidas da bactéria total, da parede bacteriana ou de proteínas secretadas na cultura foram testadas. As preparações envolvendo as proteínas de filtrado de cultura têm sido amplamente estudadas. Muitos grupos demonstraram sua capacidade em induzir proteção (Andersen, 1994; Horwitz et al., 1995), embora Roberts et al. (1995) descreveram que a proteção não seria de longa duração como aquela induzida pelas vacinas atenuadas.

Com a descoberta das técnicas de manipulação do DNA recombinante, o genoma de *M. tuberculosis* foi identificado quase completamente (Cole et al., 1998), possibilitando a caracterização de inúmeros antígenos imunogênicos, e até mesmo imunodominantes, que se revelaram candidatos promissores para o desenvolvimento de vacinas contra a TB. No entanto, as vacinas de subunidades protéicas contra TB, apesar serem consideradas seguras, exigiam alto custo de produção. Quando testadas estas vacinas mostraram-se pouco imunogênicas, sendo necessária a administração de adjuvantes eficazes, ainda indisponíveis para uso clínico, que auxiliassem a indução de resposta celular.

Uma nova forma de vacinação usando DNA que contém o gene para o antígeno de interesse tem sido bastante explorada na última década. Esta construção é eficiente pelo fato de estimular tanto a resposta humoral quanto a celular (Gurunathan et al., 2000). As vacinas de DNA são, atualmente, testadas em

uma série de modelos de infecção experimental em camundongos (Gurunathan et al., 2000) e também em primatas não humanos (Barouch et al., 2000; Kita et al., 2005). Algumas já ultrapassaram os ensaios pré-clínicos e estão sendo testadas em ensaios clínicos de fase I (Macgregor et al., 2002; Epstein et al., 2004).

Em 1990, Wolff et al. foram os primeiros a mostrar que a vacinação por via intramuscular com DNA plasmideal em solução, codificando diferentes “reporter genes”, induzia a expressão de proteínas por células musculares. Este estudo forneceu a base para o conceito de que a liberação de DNA *in vivo* poderia resultar na expressão direta de proteína. Em seguida, Ulmer et al. (1993) mostraram que a vacina de DNA codificando a nucleoproteína do vírus da influenza conferia proteção contra o vírus. Esta vacina estimulava tanto a produção de anticorpos como a ativação dos linfócitos TCD8<sup>+</sup>. A partir daí, muitos estudos envolvendo modelos murinos sugeriram os mecanismos envolvidos na indução destas respostas pelas vacinas de DNA (Chattergoon et al., 1998; Porgador et al., 1998).

As vacinas de DNA experimentais fornecem algumas vantagens que merecem ser destacadas: mimetizam os efeitos de vacinas vivas atenuadas, sendo capazes de induzir respostas de células TCD8<sup>+</sup> restritas às moléculas de classe I do MHC; são mais seguras em relação às vacinas vivas atenuadas, podendo ser administradas até mesmo em indivíduos imunocomprometidos; além disso, as vacinas de DNA são fáceis de serem estocadas.

Outra característica importante das vacinas de DNA é a presença de seqüências citosina-guanina (CG) não metiladas que desempenham funções essenciais na sua imunogenicidade. Estes dinucleotídeos, denominados de seqüências CpG, estão presentes naturalmente no DNA bacteriano e representam um sinal de perigo para o sistema imune inato (Krieg et al., 1995). No genoma dos vertebrados, as seqüências CpG, além de estarem presentes em baixas quantidades, são também metiladas, não apresentando capacidade imunoestimulatória. Seqüências CpG sintéticas, denominadas oligodeoxinucleotídeos sintéticos (CpG-ODNs) ou DNA bacteriano são capazes de ativar diferentes tipos celulares, tais como linfócitos B humanos e murinos, os quais passam a proliferar e secretar anticorpos e citocinas como a IL-6 (Krieg et al., 1995). CpG-ODN também estimulam células APCs murinas, como macrófagos e células dendríticas, a secretarem citocinas como IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$  ou a sintetizarem o RNAm para as mesmas (Klinman et al., 1996; Stacey et al., 1996) e a modularem

positivamente a expressão de moléculas coestimulatórias e de adesão (Hartmann et al. 1999). Células NK, após serem ativadas por seqüências CpG, secretam IFN- $\gamma$  (Ballas et al., 1996). Dessa forma, a presença destas seqüências na estrutura do plasmídeo da vacina de DNA confere uma propriedade adjuvante natural. O DNA bacteriano, com suas seqüências CpG não metiladas, é classificado como um tipo de PAMP, cujo principal receptor descrito como o seu ligante é o TLR9. Diferente dos outros membros da família de TLR, a expressão do TLR9 parece ser principalmente intracelular (Latz et al., 2004).

A trajetória que o DNA deve percorrer ao transfectar uma célula requer várias etapas, ainda pouco conhecidas. Inicialmente, supõe-se que ocorra a endocitose ou macropinocitose (Basner-Tschakarjan, 2004), seguido de sua interação com o receptor intracelular TLR9 (Hemmi et al., 2001; Latz et al., 2004). Uma vez internalizado, o DNA é direcionado para o núcleo a fim de que seja transcrito, e posteriormente, traduzido. Alguns estudos descreveram que após a administração do DNA, a quantidade de antígeno expresso *in vivo* encontrava-se na faixa de picogramas a nanogramas (Manickan et al., 1995). Sendo assim, baixa concentração de antígeno parece ser produzida após vacinação com DNA, sugerindo que a eficiência deste tipo de vacina poderia estar centralizada na propriedade imunoestimulatória do DNA, devido às seqüências CpG, e também no tipo de APC transfectada.

Após a transfecção da célula hospedeira, a transcrição e a tradução, resultando na expressão do produto gênico, o antígeno deve estimular a resposta imune, sendo inicialmente processado e apresentado. Existem pelo menos três mecanismos pelos quais o antígeno codificado pelo DNA plasmideal é processado e apresentado para as células da imunidade específica: 1) estimulação direta pela transfecção de miócitos, queratinócitos ou outras células que não expressam moléculas de MHC de classe II (Corr et al., 1996); 2) transfecção direta de APCs profissionais, como macrófagos e células dendríticas (Iwasaki et al., 1997); 3) estimulação cruzada ("cross-priming"), na qual o DNA plasmideal transfecta uma célula somática ou uma célula APC profissional e a proteína secretada é fagocitada por outra célula APC e apresentada para os linfócitos T (Gurunathan et al., 2000).

O Centro de Pesquisas em Tuberculose da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CPT-FMRP-USP) desenvolveu uma vacina de DNA baseada no gene que codifica a proteína de choque térmico de 65 kDa de *Mycobacterium leprae*

(DNA-hsp65). Esta vacina constitui-se do plasmídeo pcDNA3, que contém o gene para resistência à ampicilina, no qual foi clonado o gene da hsp65. Quando administrada por via intramuscular em camundongos desafiados com *M. tuberculosis* ou em camundongos infectados com os bacilos e posteriormente tratados com esta vacina, a preparação apresentou efeito profilático e terapêutico, respectivamente (Bonato et al., 1998; Lowrie et al., 1999; Silva et al., 1999; Bonato et al., 2004). O efeito profilático desta vacina de DNA estava associado com a produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> que expressavam altos níveis da molécula de adesão CD44, além da atividade citotóxica (Bonato et al., 1998), sendo o efeito protetor semelhante ao conferido pela vacina BCG (Silva et al., 1999). Nosso grupo também estudou os mecanismos imunológicos associados ao efeito terapêutico, que foi caracterizado pelo restabelecimento da produção de IFN- $\gamma$ , ativação de linfócitos TCD8<sup>+</sup> e menor comprometimento do parênquima pulmonar (Bonato et al., 2004).

Atualmente, o CPT-FMRP-USP tem se dedicado a investigar estratégias que possibilitem a otimização do efeito profilático dessa preparação vacinal. Essa preocupação se justifica pelo fato de que as vacinas de DNA parecem induzir proteção eficiente em modelos experimentais que envolvem o uso de camundongos. Entretanto, quando testadas em modelos envolvendo animais de maior porte, a eficácia das mesmas parece ser menor (Puaux & Michel, 2003). Diante desse contexto, o CPT-FMRP-USP tem avaliado o potencial protetor e/ou imunogênico dessa vacina liberada por diversos veículos para o sistema imune do hospedeiro (Lima et al., 2003a; Lima et al., 2003b; Ruberti et al., 2004). Além disso, nosso grupo também tem estudado o tráfego intracelular do plasmídeo de DNA, desde sua aplicação até sua transcrição no núcleo (Coelho-Castelo et al., 2003).

Recentemente, o grupo da Dra. Sílvia C. Leão (UNIFESP) disponibilizou para o CPT-FMRP-USP uma nova preparação vacinal que consiste no gene da hsp65 clonado no vetor pVAX. A principal diferença entre o vetor pVAX e o vetor pcDNA3 é o gene para a resistência a antibióticos, no qual o pVAX apresenta o gene de resistência à kanamicina, enquanto o pcDNA3 apresenta o gene de resistência à ampicilina. Nosso grupo vem realizando estudos comparativos entre a capacidade protetora do pcDNA3-hsp65 e do pVAX-hsp65 em modelos experimentais. Devido à presença do gene da kanamicina, o vetor pVAX é liberado para ensaios clínicos, enquanto o pcDNA3 não é liberado. Diante das informações descritas, é essencial avaliar a interação da vacina DNA-hsp65 (construção pVAX-hsp65) com células

humanas para dar continuidade aos estudos que possibilitem o desenvolvimento de uma nova vacina ou terapia imune contra a TB.

## *Objetivos*

---

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Avaliar o potencial imunestimulatório da vacina DNA-hsp65 (construção pVAX-hsp65) sobre macrófagos e células dendríticas humanas diferenciadas a partir de monócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis.

### Objetivos Específicos

**A.** Avaliar a captura da vacina DNA-hsp65 por macrófagos e células dendríticas humanas.

**B.** Avaliar a transcrição do gene da hsp65 por estas APCs.

**C.** Avaliar a expressão do receptor TLR9 intracelular.

**D.** Avaliar o grau de ativação de macrófagos e células dendríticas humanas após estimulação com DNA-hsp65 através da expressão de moléculas coestimulatórias e da produção de citocinas e quimiocinas, comparando à estimulação com LPS, utilizado como controle positivo.

**E.** Avaliar a ativação de linfócitos T por macrófagos e células dendríticas estimulados com DNA-hsp65.

**F.** Avaliar a capacidade microbicida de macrófagos e células dendríticas humanas estimulados com DNA-hsp65 e posteriormente infectados por *M. tuberculosis*.

## *Material e Métodos*

---

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Células

#### 1.1 Obtenção de monócitos a partir de células mononucleares de sangue periférico

Inicialmente, ressaltamos que este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP-USP) com o processo HCRP Nº 9192/2002.

Células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram obtidas de doadores saudáveis da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto e isoladas por centrifugação em gradiente de densidade com Ficoll-Paque (Amersham, Uppsala, Sweden) a partir de bolsa de concentrado de leucócitos. A suspensão de leucócitos foi diluída na proporção 1:1 em solução fostato tamponada (PBS), e para cada 20 mL da suspensão, foram utilizados 10 mL de Ficoll-Paque. Após a preparação, o gradiente foi centrifugado a 30 x g por 30 minutos, a 25°C, e em seguida, o anel de células mononucleares foi coletado e lavado duas vezes em PBS. Monócitos foram isolados a partir de CMSP por centrifugação em gradiente de densidade com Percoll (Amersham, Uppsala, Sweden). O gradiente de Percoll foi preparado adicionando-se 9 mL de Percoll e 1 mL de PBS 10 vezes concentrado, juntamente com 10 mL de PBS contendo o anti-coagulante ACD (Ácido Citrato Dextrose) a 0,6%. Neste preparado, adicionou-se um volume de 10 mL de PBS com CMSP em suspensão. O gradiente foi centrifugado a 19 x g por 35 minutos, a 25°C. Em seguida, o anel de monócitos foi coletado e lavado duas vezes em PBS. As células foram contadas em câmara de Neubauer após diluição 1:100 em corante azul de tripan (Intermat, São Paulo, Brasil), e distribuídas em placas de 24 poços (Corning, NY, USA) na concentração de  $1,5 \times 10^6$  células/mL.

#### 1.2 Obtenção de monócitos CD14<sup>+</sup> com esferas magnéticas

Nos experimentos de infecção de macrófagos e de células dendríticas com *M. tuberculosis*, o isolamento de monócitos CD14<sup>+</sup> do sangue periférico foi realizado por seleção positiva com o uso de esferas magnéticas (Miltenyi Biotec, Auburn, CA,

USA) com o objetivo de trabalharmos com uma população de monócitos totalmente purificadas, na ausência de linfócitos contaminantes.

### **1.3 Diferenciação de macrófagos a partir de monócitos**

Para a diferenciação em macrófagos,  $1,5 \times 10^6$  monócitos/mL foram cultivados por 7-10 dias em placas de cultura de 24 poços (Corning; NY, USA) com 1 ng/mL de fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, do inglês *Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor*) (PharMingen, San Diego, USA), em meio RPMI 1640 (GIBCO; Grand Island, NY) suplementado com 10% de soro bovino fetal (GIBCO; Grand Island, NY, USA), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e gentamicina (10 µg/mL) (GIBCO; Grand Island, NY), 50 µM de 2 mercapto-etanol (ME) (Sigma-Aldrich; França). O meio foi trocado a cada 2 dias, com a reposição da citocina recombinante.

### **1.4 Diferenciação de células dendríticas a partir de monócitos**

Para a diferenciação em células dendríticas,  $1,5 \times 10^6$  monócitos/mL foram cultivados por 7-10 dias em placas de cultura de 24 poços (Corning; NY, USA) com 7 ng/mL de GM-CSF e 14 ng/mL de IL-4 (ambos da PharMingen, San Diego, USA), em meio RPMI 1640 (Sigma; St. Louis, NY, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (GIBCO; Grand Island, NY, USA), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e gentamicina (10 µg/mL) (GIBCO; Grand Island, NY) e 50 µM de 2 mercapto-etanol (ME) (Sigma-Aldrich; França). O meio foi trocado a cada dois dias, com a reposição das citocinas recombinantes.

## **2. Obtenção da vacina DNA-hsp65 e do vetor pVAX**

Os plasmídeos pVAX-hsp65 (vacina DNA-hsp65) e pVAX (vetor) foram purificados por cromatografia de troca iônica, utilizando-se o QUIAGEN Giga Plasmid Purification Kit (Qiagen Inc., Santa Clarita, CA, USA). Para a realização desse protocolo, uma colônia de bactérias *E. coli* DH5α™ transformada com o plasmídeo recombinante DNA-hsp65 ou plasmídeo pVAX foi retirada de uma placa recém preparada com meio LB Agar (SIGMA, Germany) e canamicina (Cilinson®) na concentração de 100 µg/mL. Esta colônia foi transferida para 5 mL meio LB BROTH BASE (GIBCO BRL, Scotland) com canamicina (100 µg/mL) e cultivada durante 8

horas a 37°C em incubadora sob agitação vigorosa (250 rpm) (Incubador shaker series 25, New Brunswick, Edison, New Jersey, USA). A cultura inicial foi diluída 1:500 em 2,5 L de meio LB BROTH BASE, contendo canamicina (100 µg/mL), e incubada a 37°C sob agitação (250 rpm) durante 16 horas. Após incubação, o material foi centrifugado a 6000 x g por 15 minutos a 4°C e o sedimento ressuspenso em 125 mL de tampão P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM e RNase 100 µg/ml). Em seguida, foram adicionados 125 mL de tampão P2 (NaOH 200 mM; SDS 1%) e após 5 minutos foram adicionados 125 mL do tampão P3 (acetato de potássio 3,0 M pH 5,5). O material foi filtrado e mantido no gelo por 30 minutos. O filtrado foi aplicado em resina da QUIAGEN® previamente equilibrada com tampão QBT (NaCl 750 mM; MOPS 50 mM pH 7,0; etanol 15% e Triton X-100 0,15 %). Após a aplicação do filtrado, a resina foi lavada com 600 mL de tampão QC (NaCl 1,0 M; MOPS 50 mM pH 7,0; etanol 15 %) e o DNA plasmideal foi eluído com 30 mL de tampão QF (NaCl 1,25 M; MOPS 50 mM pH 7,0; etanol 15 %). O DNA eluído foi precipitado em 52,5 mL de isopropanol e em seguida centrifugado a 15000 x g por 45 minutos a 4°C. O sedimento resultante foi ressuspenso em 0,5 - 1,0 mL de água Milli-Q. A quantificação dos plasmídeos DNA-hsp65 e pVAX foi realizada por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, utilizando o aparelho UV-1650 PC (Shimadzu). Os níveis de endotoxina foram determinados pelo Limulus Amoebocyte Lysate Kit QCL-1000 (Cambrex Company, Walkersville, MD). Segundo o FDA (*Food and Drug Administration*, USA), os níveis aceitáveis de endotoxina em amostras são aqueles iguais ou menores que 0.1 unidades de endotoxina (UE) / µg DNA. Verificamos que nossas amostras estavam dentro dos níveis aceitáveis.

### **3. Análise do DNA plasmideal purificado**

Após a purificação da vacina DNA-hsp65 e do vetor pVAX, amostras desses plasmídeos foram digeridas com a enzima de restrição *Bam* HI (GIBCO, Grand Island, NY) da seguinte forma: 1 µL do plasmídeo, na concentração de 1 µg/µL, foi adicionado a 0,5 µL de *Bam* HI, 2 µL do tampão React-3 (GIBCO, Grand Island, NY) e o volume final foi acertado para 20 µL com água Milli-Q. A amostra foi incubada por 1 noite a 37°C, e em seguida, aplicada em gel de agarose 1%.

#### **4. Proteínas de filtrado de cultura de *M. tuberculosis***

As proteínas do filtrado de cultura de *M. tuberculosis* (PFC) foram cedidas pelo Dr. Gilles Marchal, do Instituto Pasteur – Paris, França.

##### **4.1 Oligodeoxinucleotídeos CpG (CpG-ODN)**

Nos experimentos de estimulação de macrófagos e células dendríticas com PFC, utilizamos também como estímulo PFC acrescido de CpG-ODN. A seqüência do CpG-ODN utilizado, descrito como CpG 2006 (imunoestimulatório para células humanas), foi a seguinte:

TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT

Este CpG-ODN foi sintetizado pela Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

#### **5. Marcação da vacina de DNA com Alexa Fluor**

Para a marcação da vacina DNA-hsp65 com Alexa, utilizou-se o kit ULYSIS Alexa Fluor 594 Nucleic Acid Labeling Kit (Molecular Probes; Oregon, USA). A preparação da amostra consistiu em adicionar 19 µL do tampão C do Kit em 10 µg da vacina de DNA, incubando-se por 5 minutos a 95°C no termociclador PTC-200™ (MJ Research, Inc.). Logo após, em gelo, foram adicionados 2,5 µL do Alexa, incubando-se por 15 minutos a 80°C. Ao final do protocolo, foram adicionados 100 µL de isopropanol, incubando-se por uma noite para a precipitação do DNA. Decorrido o tempo de incubação, o DNA foi centrifugado a 12000 x g por 15 minutos, a 4°C. O DNA marcado foi ressuspenso em PBS, sendo utilizada a quantidade de 2 µg de DNA para estímulo das culturas de macrófagos e células dendríticas. Após 4 horas de estimulação, as culturas foram fotografadas em microscópio de fluorescência Nikon E800 (Nikon Eclipse E800-Nikon Instruments Inc., Melville, NY) e as imagens foram adquiridas com a câmera digital Nikon DXM-1200 (Nikon Instruments Inc.) conectada ao microscópio.

#### **6. Microscopia confocal para análise de TLR9 intracelular**

Macrófagos e células dendríticas humanas foram distribuídos em lâminas de vidro cobertas com o fixador celular Cell-Tak (Collaborative Research, New Bedford, MA) e fixados com PBS contendo paraformaldeído a 4% (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA) durante 15 minutos a 37°C. A seguir, as células

foram permeabilizadas com PBS contendo Triton X-100 a 0,3 % (Sigma, St. Louis, MO, USA) durante 10 minutos a 25°C, e posteriormente, foram lavadas com glicina 0,1 M (Sigma, St. Louis, MO, USA) por 5 minutos, seguido por duas lavagens com PBS. A marcação foi realizada com anticorpo monoclonal anti-TLR9 (mAb anti-TLR9) purificado (5 µg/mL) (Imgenex, San Diego, USA) durante 30 minutos a 4°C. As células foram lavadas 3 vezes com PBS, e em seguida, foram incubadas com IgG de camundongo biotinizada (Bioscience, Toronto, Canada) (7.5 µg/mL), anti-imunoglobulina humana, durante 1 hora a temperatura ambiente. Após série de 3 lavagens com PBS, as células foram incubadas com streptavidina marcada com Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR) por 30 minutos, em temperatura ambiente. Decorrido o tempo de incubação, as células foram lavadas 5 vezes com PBS. A lâmina foi montada pela fixação de lamínula de vidro com Fluormount (EM Sciences, Fort Washington, PA). As lâminas foram fotografadas em microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS SP2 AOBS (Manheim, Alemanha).

## **7. Produção de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)**

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos e de células dendríticas estimulados por 48 horas com a vacina DNA-hsp65 ou com PFC foram avaliados quanto à produção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-12p40, MCP-1 e IP-10 por ELISA. Placas de 96 poços (Corning; NY, USA) foram recobertas com solução contendo anticorpo purificado de captura anti-IL-6, IL-10, IL-12p40, MCP-1 ou IP-10 de humano (PharMingen, San Diego, USA), diluídos em tampão fosfato de sódio (pH 9,0) nas seguintes concentrações: IP-10 a 0,5 µg/mL, IL-10 a 1 µg/mL, TNF, IL-6, IL-12p40 e MCP-1 a 2 µg/mL. As placas foram incubadas a 4°C, durante uma noite. Após sucessivas lavagens com solução PBS contendo Tween 20 a 0,05%, as placas foram incubadas com solução de bloqueio, constituída de PBS contendo 10% de soro bovino fetal, durante 1 hora, à temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e incubadas durante uma noite, a 4°C, com as amostras e as respectivas curvas de citocinas recombinantes, diluídas na base 2 em tampão PBS contendo 10% de soro bovino fetal e 0,05% de Tween 20. Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas e incubadas com os anticorpos anti-IL-6, IL-10, IL-12p40, MCP-1 ou IP-10 humanos biotinizados, diluídos em tampão PBS contendo 10% de soro bovino fetal e 0,05% de Tween 20 nas seguintes concentrações: IL-10

e MCP-1 a 0,5 µg/mL; TNF, IL-6, IL-12p40 e IP-10 a 1 µg/mL. Após incubação de 1 hora, à temperatura ambiente, as placas foram lavadas e seguiu-se a incubação com a solução AB (Dako, Denmark) durante 30 minutos, à temperatura ambiente, sendo estreptoavidina e peroxidase diluídas 1:1000 em tampão PBS contendo 10% de soro bovino fetal e 0,05% de Tween 20. As placas foram lavadas e reveladas com OPD (Sigma; St. Louis, MO, USA). A reação foi interrompida com a adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 16% e a leitura foi realizada em 490 nm.

## 7.1 Relação dos clones de anticorpos utilizados no ELISA

→ Anticorpos purificados (captura):

ANTICORPO	CLONE
TNF	Mab1
IL-6	MQ2-13A5
IL-10	JES3-19F1
IL-12p40	C8.3
MCP-1	107F.2
IP-10	4D5/A7/C5

→ Anticorpos biotinilados:

ANTICORPO	CLONE
TNF	Mab11
IL-6	MQ2-39C3
IL-10	JES3-12G8
IL-12p40	C8.6
MCP-1	5D3-F7
IP-10	6D4/D6/G2

## 8. Citometria de fluxo

### 8.1 Anticorpos monoclonais

A caracterização das populações de macrófagos e de células dendríticas estimulados com a vacina DNA-hsp65 e demais controles experimentais foi realizada com anticorpos anti-Mac-1 (clone ICRF44) e anti-CD11c (clone B-ly6) respectivamente, e com o isotipo controle IgG1 de camundongo (clone MOPC-21), marcados com Cy-chrome. Para a avaliação do fenótipo celular, os seguintes anticorpos monoclonais contra receptores de superfície foram utilizados: marcados com PE (ficoeritrina): anti-HLA-DR (clone G46-6), anti-CD86 (clone IT2.2), anti-CD83 (clone HB15e) e o isotipo controle IgG2b de camundongo (clone 27-35). O anticorpo anti-CD80 (clone BB1) e o isotipo controle IgM de camundongo (clone G155-228) eram marcados com FITC (isotiocianato de fluoresceína). Todos os anticorpos foram adquiridos da PharMingen (San Diego, USA) e utilizados de acordo com as

instruções do fabricante. O anticorpo anti-receptor para manose marcado com PE (clone 19.2) também foi adquirido da PharMingen. O anticorpo purificado de camundongo anti-TRL9 humano (clone 26C593) foi adquirido da Imgenex (Imgenex; Sorrento Valley, USA). Para a visualização da marcação, foi utilizado um mAb anti-IgG de camundongo biotinizada (Ebioscience).

## **8.2 Avaliação da morte celular por apoptose de macrófagos e células dendríticas após estimulação com DNA-hsp65 ou PFC**

Para a avaliação da morte celular por apoptose em culturas de células estimuladas com DNA-hsp65 ou PFC, macrófagos e células dendríticas estimulados por 48 horas foram coletados e separados em tubos FACS previamente identificados. Foram adicionados aos tubos 15  $\mu$ L de 7-amino-actinomicina-D (7AAD) (Calbiochem, Darmstadt, Germany) na concentração de 200  $\mu$ g/mL e os tubos foram incubados a 4°C por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram adquiridas no FACSort (Becton & Dickinson). A análise foi feita utilizando-se o programa Cell-Quest (versão 3.3), com base na porcentagem de células 7AAD<sup>+</sup> detectadas no canal de fluorescência FL3.

## **8.3 Avaliação do fenótipo de macrófagos e células dendríticas após estimulação com a vacina DNA-hsp65 ou PFC**

Após 48 horas de estimulação com a vacina DNA-hsp65 ou demais estímulos, macrófagos e células dendríticas foram coletados, lavados com PBS e distribuídos em tubos FACS previamente identificados. As células foram incubadas com os anticorpos monoclonais de interesse durante 30 minutos a 4°C, na ausência de luz. As amostras foram lavadas com PBS contendo 2% de soro bovino fetal e ressuspensas em 100  $\mu$ L de PBS contendo 1% de formaldeído (MERCK). Para a marcação de TLR9 intracelular, as células foram previamente permeabilizadas e fixadas com Cytotfix/cytoperm (PharMingen, San Diego, USA) por 20 minutos, sendo então ressuspensas em Perm-wash (PharMingen, San Diego, USA). As células foram marcadas com anti-TLR9 humano purificado de camundongo (Imgenex, Sorrento Valley, USA) e incubadas por 30 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas com anticorpo biotinizado anti-IgG de camundongo por 1

hora a temperatura ambiente. O reagente streptavidina marcada com PE foi adicionado (Pharmingen, San Diego, USA), juntamente com anticorpo anti-Mac-1 ou anti-CD11c marcados com Cy-chrome (Pharmingen, San Diego, USA). As células foram lavadas e ressuspensas em PBS contendo 1% de Formaldeído. A aquisição das amostras foi realizada no FACSsort (Becton & Dickinson). Inicialmente, macrófagos ou células dendríticas foram selecionados de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC), seguida de seleção através da marcação positiva para Mac-1, caracterizando os macrófagos, ou da marcação positiva para CD11c, caracterizando as células dendríticas. Foram coletados aproximadamente 3000 macrófagos Mac-1<sup>+</sup> ou células dendríticas CD11c<sup>+</sup> por amostra. Para a análise da expressão dos receptores de superfície, foi utilizado o programa Cell-Quest (versão 3.3). A expressão dos receptores de superfície analisados foi caracterizada como porcentagem de células positivas ou através da mediana da intensidade de fluorescência (MIF), que fornece uma estimativa da densidade do receptor estudado na superfície celular. Para ambas as análises, isotipos controles para cada anticorpo de interesse foram utilizados com o intuito de delimitar as populações negativas e positivas para cada receptor.

## **9. Proliferação de linfócitos T e detecção de IFN- $\gamma$ e IL-5**

Linfócitos TCD4<sup>+</sup> ou TCD8<sup>+</sup> foram purificados por seleção positiva com o uso de microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec). Um total de  $1 \times 10^5$  células TCD4<sup>+</sup> (células respondedoras) foram marcadas com 5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE) (Molecular Probes, Oregon, USA) e colocadas em contato com  $1 \times 10^5$  macrófagos ou células dendríticas (células estimuladoras) previamente estimulados ou não com 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  da vacina DNA-hsp65 ou vetor pVAX. Como controle positivo, as células TCD4<sup>+</sup> foram estimuladas com 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anticorpos monoclonais anti-CD3 (clone HIT3a) e anti-CD28 (clone CD28.2), respectivamente (Pharmingen, San Diego, CA, USA). Após 5 dias, as células foram coletadas, e linfócitos TCD4<sup>+</sup> foram analisados por citometria de fluxo quanto ao conteúdo de CFSE. Em paralelo, linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> foram previamente estimulados com anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD28 durante 48 horas, juntamente com IL-2 (10  $\text{ng}/\text{mL}$ ) nas últimas 24 horas. Após esse período, as células foram incubadas durante 72 horas com sobrenadantes obtidos de culturas

de macrófagos e células dendríticas previamente estimulados ou não com DNA-hsp65. A produção de IFN- $\gamma$  e IL-5 foi avaliada por ELISA, conforme descrito anteriormente.

## **10. Extração de RNA total de culturas de macrófagos e células dendríticas humanas**

As células foram ressuspensas em 200  $\mu$ L de solução salina previamente tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) e a suspensão formada foi transferida para um tubo Eppendorf 1,5 mL estéril. O reagente Trizol (Invitrogen, USA) foi acrescentado (1000  $\mu$ L) e as células foram lisadas com o auxílio de pipeta automática. As amostras homogeneizadas permaneceram em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente para dissociação nucleoprotéica. Posteriormente, foram acrescentados 200  $\mu$ L de clorofórmio, seguindo-se de agitação manual durante 30 segundos e incubação à temperatura ambiente por 3 minutos. Após esse período as amostras foram centrifugadas a 926 x g por 15 minutos e a fase aquosa superior foi recolhida em um tubo Eppendorf 1,5 mL estéril.

Para a precipitação do RNA foram adicionados 700  $\mu$ L de isopropanol gelado sobre o sobrenadante coletado. As amostras foram estocadas em isopropanol a –70°C. Antes de serem usadas, as amostras em isopropanol foram centrifugadas durante 12 minutos a 12000 x g a 4°C. O sedimento formado foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75% e centrifugado a 12000 x g por 5 minutos a 4°C. Após secagem em tubo aberto, o sedimento foi dissolvido em 20  $\mu$ L de água livre de RNase e DNase (Gibco, NY, USA).

### **10.1 Eletroforese de amostras de RNA total em gel denaturante**

A quantificação do RNA foi realizada em GeneQuant (Pharmacia). Após a quantificação, foi preparado um gel de agarose (Sigma, EUA) denaturante 1,5% para visualização da integridade do RNA. A confecção do gel foi realizada acrescentando-se 30 mL de formaldeído 37% e 33 mL de tampão de migração MOPS 5x (20,6 g de MOPS dissolvidos em 800 mL de acetato de sódio 50 mM, pH 7,0, ajustado com hidróxido de sódio 2 N e adicionado 10 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0; volume final ajustado para 1000 mL) a 87 mL de agarose fundida em água Milli-Q autoclavada. Um  $\mu$ L de solução de RNA (aproximadamente de 1  $\mu$ g) foi denaturado adicionando-

se 2  $\mu\text{L}$  de tampão MOPS 5x; 7 a 7,5  $\mu\text{L}$  de formaldeído 37% (Merck, Alemanha) e 10,0  $\mu\text{L}$  de formamida (Gibco, Grand Island, NY, USA). Esta solução foi incubada a 65°C por 15 minutos, sendo resfriada imediatamente em banho de gelo. Em seguida, 1  $\mu\text{L}$  de brometo de etídeo diluído 3:1 (solução estoque 10 mg/mL) e 2  $\mu\text{L}$  de *dye loading solution* (1/10 do volume) foram adicionados à solução contendo a amostra de RNA. Após eletroforese a 80V durante 60 minutos, as bandas de RNA foram visualizadas em transiluminador UV e fotografadas em Polaroid.

## 11. Detecção de RNAm para a hsp-65 por RT-PCR

O RNA total, obtido conforme descrito no item anterior, foi tratado com a enzima Amplification grade DNase I (Gibco BRL) para a completa degradação de DNA, eliminando assim a possibilidade de contaminação com o DNA genômico. Para o tratamento de 1 $\mu\text{g}$  de RNA total, foi adicionado 1 $\mu\text{L}$  da enzima Amplification grade DNase I, 1 $\mu\text{L}$  do tampão (20 mM de Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM de KCl e 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ ) e água livre de RNase e DNase (Gibco BRL), para completar o volume final de 10 $\mu\text{L}$ . A reação foi mantida por 15 minutos a 25°C e inativada com a adição de 1 $\mu\text{L}$  de EDTA (25mM), incubando-se 15 minutos a 65°C. Para o controle desse processo, 1 $\mu\text{g}$  da amostra foi submetida a reação em cadeia da polimerase (PCR). Após o tratamento da amostra com DNase, adicionou-se a enzima SuperScript™ II (Gibco BRL) para a síntese de cDNA fita simples. Para cada amostra foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  de oligo (dT)<sub>12-18</sub> (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Gibco BRL) e 1  $\mu\text{L}$  da mistura de dNTP a 10 mM. A amostra foi mantida por 10 minutos a 70°C e, em seguida, foi adicionado o tampão da enzima numa concentração final de 50 mM (Tris-HCl, pH 8,4, 75 mM de KCl, 3 mM de  $\text{MgCl}_2$  e 0,02 mM de DTT). A amostra foi equilibrada por 2 minutos a 42°C e incubada com 1  $\mu\text{L}$  (200 U) de *SuperScript™* durante 50 minutos a 42°C. A reação foi inativada pela incubação por 15 minutos a 70°C. Em seguida, o cDNA obtido foi submetido à PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*). Três microlitros do cDNA fita simples foi utilizado como molde para a amplificação do cDNA específico. Primeiramente, para verificar a qualidade do cDNA obtido, realizou-se o PCR utilizando os primers da  $\beta$ -actina, e posteriormente os primers da hps65. Para cada reação (50  $\mu\text{L}$ ), foram adicionados 10 mM de cada dNTP, 20 mM de Tris-HCl pH 8,4, 50 mM de KCl, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 2,5 unidades da *Taq* DNA polimerase (Gibco BRL) e 10 pmoles de cada primer. Os pares de *primers* para a  $\beta$ -actina foram 5'

ATGTTTGAGACCTTCAACA 3' e 5' CACGTCAGACTTCATGATGG 3' e para a hsp65 foram 5' - ACCAACGATGGCGTGTCCAT - 3' e 5'- AAGGATGTAGGGCTCCTC - 3'. A reação foi incubada em um termociclador PTC-200™ (MJ Research, Inc.) por 3 minutos a 95°C, e em seguida, submetida a 35 ciclos de amplificação com denaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 90 segundos e uma extensão final de 10 minutos. A amostra obtida foi analisada em eletroforese gel de agarose 1%.

## **12. Obtenção de *M. tuberculosis* para infecção *in vitro***

A suspensão de *M. tuberculosis*, linhagem H37Rv (ATCC nº 27294), foi obtida a partir de uma alíquota congelada a -70°C. Cinquenta µL da alíquota (com viabilidade superior a 85%) foram semeados em meio Lowenstein-Jensen seguindo-se incubação de 20 a 30 dias, a 37°C. Uma alça da cultura em meio Lowenstein-Jensen foi adicionada a 10 mL de meio 7H9 (Difco, Detroit, USA), sendo incubada por 7 a 10 dias, a 37°C. Após a viabilidade ser novamente verificada, o número de bacilos da suspensão foi determinado através da densidade óptica da cultura a 540 nm, comparando-a com uma curva previamente padronizada no CPT-FMRP-USP. A suspensão foi então centrifugada a 4000 x g por 20 minutos. O sedimento foi ressuspensão em 1 mL de salina estéril e agitado vigorosamente em tubo cônico com pérolas de vidro estéreis por 2 minutos. A concentração de bacilos foi acertada por diluição em meio de cultura RPMI, com 10% de soro bovino fetal e sem adição de antibióticos.

## **13. Infecção *in vitro* de macrófagos e células dendríticas**

Macrófagos e células dendríticas estimulados ou não com DNA-hsp65 foram lavados com PBS 1X e infectados com *M. tuberculosis* H37Rv numa proporção de 1 ou 5 bactérias por célula (1:1 ou 5:1) em duplicata. Quatro horas depois da infecção, o sobrenadante foi retirado e as células lavadas com meio RPMI 1640 a 900 x g, por 10 minutos, para a retirada de bactérias extracelulares. Neste período, as células foram lisadas com 1mL de uma solução de PBS contendo 0,25% de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA). Alíquotas de 100 µL de cada amostra de macrófagos ou células dendríticas, estimuladas ou não com DNA-hsp65 e infectados, foram diluídas 100, 500, 1000 ou 10000 vezes e plaqueadas em meio

7H11. O mesmo procedimento foi realizado 7 dias após a infecção. Depois de 20-30 dias, o número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi contado para a avaliação do crescimento bacteriano nesse período.

#### **14. Análise estatística**

Para a análise estatística, utilizamos o teste *t* de Student não pareado e não paramétrico (teste de Mann-Whitney). Os dados foram analisados no programa estatístico PRISM (versão 4.0, GraphPad, San Diego, CA). Foram considerados significativos os dados com  $p < 0.05$ .

## *Resultados*

---

## RESULTADOS

### 1. Protocolo de obtenção de macrófagos e células dendríticas a partir de monócitos

Várias tentativas de padronização das culturas de macrófagos e células dendríticas foram realizadas, baseando-se em protocolos experimentais publicados por diferentes grupos de pesquisa. Como tivemos em mente o objetivo de trabalhar com uma concentração conhecida de monócitos em cultura, inicialmente cultivamos as células mononucleares obtidas do sangue após realização de gradiente de Ficoll, em placas de 24 poços, por 2 horas, numa concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL. Após esse período, as células não-aderentes foram retiradas por lavagem com RPMI incompleto. Os monócitos aderentes foram incubados com salina livre de cálcio e magnésio e 0,5 mM de EDTA por 30 minutos, a 37°C, para promover a liberação celular. Desse modo, poderíamos contar os monócitos e nos certificar que teríamos poucos linfócitos contaminantes. Porém, não obtivemos um resultado satisfatório com a utilização desta metodologia.

Numa segunda tentativa tivemos o intuito de reproduzir o método publicado por Jones et al. (1989), no qual monócitos são distribuídos sobre uma camada de fibronectina, proveniente de soro humano, disposta sobre uma camada de gelatina e, posteriormente removidos por incubação com PBS e EDTA a 10 mM. A fibronectina liga-se à gelatina, enquanto os monócitos, por sua vez, interagem com a fibronectina. No entanto, a utilização deste método também não foi eficaz em promover a liberação dos monócitos aderidos a fibronectina, mesmo utilizando uma solução de RPMI e PBS com 50 mM de EDTA. Além deste protocolo, uma tentativa adicional consistiu em utilizar o “cell scraper” (Corning, NY, USA). Apesar de todas as células terem sido liberadas, a maioria não estava viável para cultura.

Em outros ensaios de padronização, submetemos as CMSP (células mononucleares de sangue periférico) ao gradiente de Percoll, o qual permite o isolamento de monócitos das demais células mononucleares. A utilização desta técnica permitiu um isolamento eficiente de monócitos, porém, as suspensões obtidas não eram totalmente puras, com a presença de linfócitos contaminantes. Observamos, por citometria de fluxo, a presença de aproximadamente 40% de linfócitos nas suspensões de monócitos obtidos a partir do gradiente de Percoll

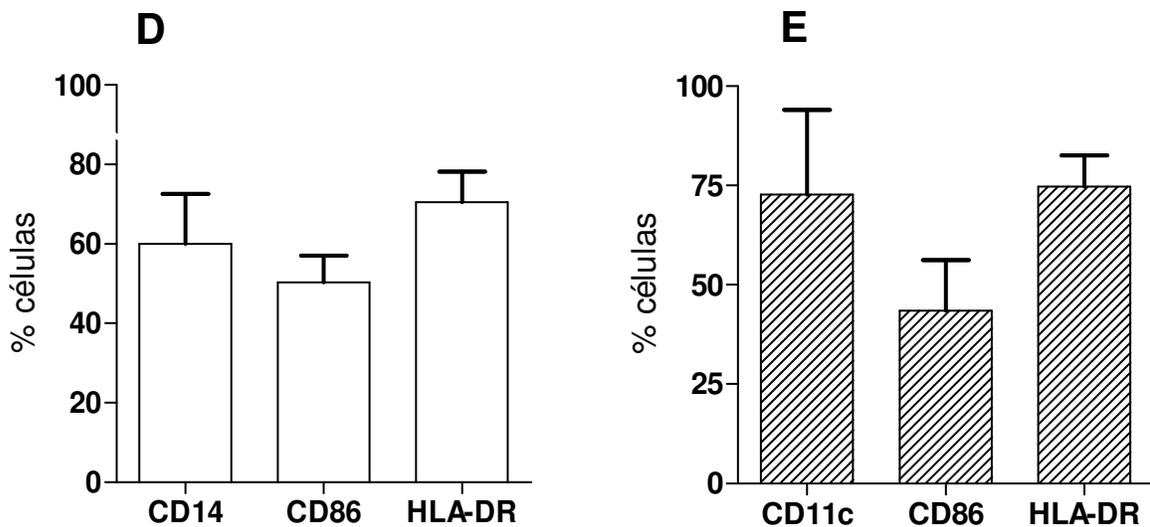
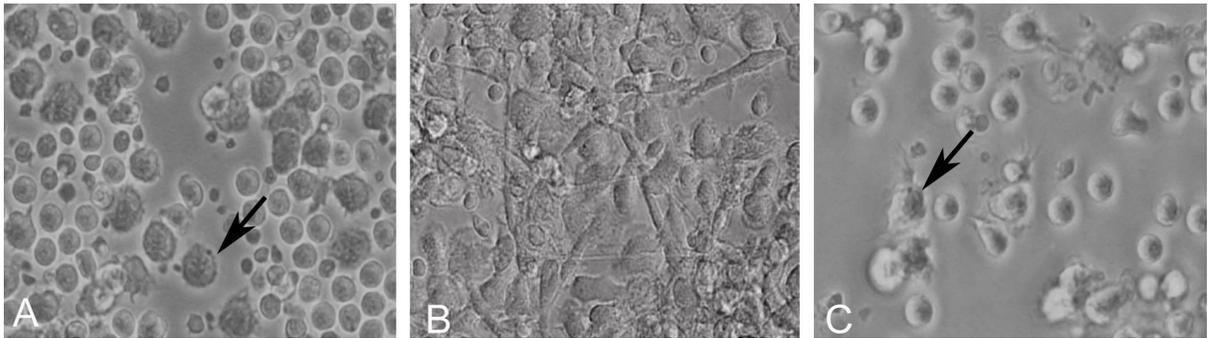
(dados não mostrados). Mais uma vez recorremos à literatura, e constatamos que linfócitos contaminantes estão presentes em maior ou menor quantidade em qualquer método de separação celular (Jones et al., 1989). Desse modo, passamos a utilizar o gradiente de Ficoll para a obtenção de CMSP e o gradiente de Percoll para a obtenção de monócitos. Os monócitos obtidos foram cultivados durante 7 dias, e ao final desse período, apresentaram morfologia típica de macrófagos (células aderentes e espreiadas).

A diferenciação de células dendríticas a partir de monócitos de sangue periférico requer a presença de citocinas recombinantes (Sallusto & Lanzavecchia, 1994). Passamos então a realizar experimentos para padronizar as concentrações de GM-CSF e IL-4 adequadas para nossas culturas de células dendríticas. Adicionalmente, verificamos que Giacomini et al. (2001) utilizavam citocinas recombinantes para diferenciar macrófagos a partir de monócitos. Testamos também diferentes concentrações de GM-CSF nas culturas de macrófagos. Finalmente, ajustamos as concentrações de 7 ng/mL de GM-CSF e 14 ng/mL de IL-4 para diferenciar células dendríticas e 1 ng/mL de GM-CSF para diferenciar macrófagos. Em ambas as culturas, o meio era trocado a cada dois dias, retirando-se metade do meio contido no poço e repondo com outro contendo a concentração de citocinas mencionadas acima.

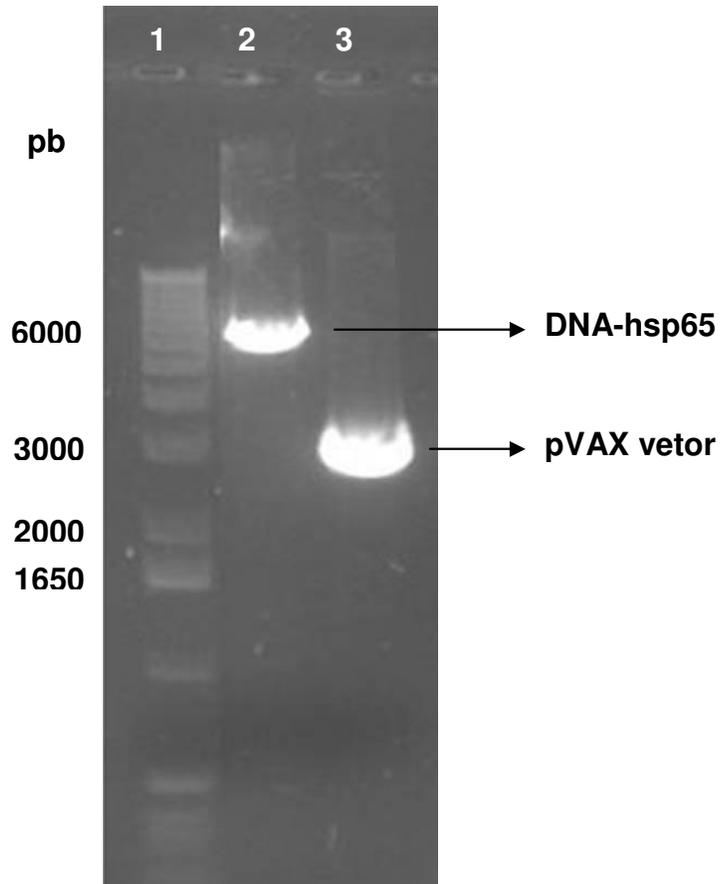
Na Figura 1A observamos uma fotomicrografia de microscopia de luz de monócitos recentemente isolados a partir de CMSP. Macrófagos podem ser observados na Figura 1B após a diferenciação de monócitos em presença de 1 ng/mL de GM-CSF. Estas células apresentaram propriedades aderentes e morfologia típica de macrófagos (“espreiada”), além de expressarem constitutivamente níveis elevados de CD14, CD86 e HLA-DR, como verificado por citometria de fluxo (Figura 1D). Na Figura 1C observamos células dendríticas obtidas a partir do cultivo de monócitos com 7 ng/mL de GM-CSF e 14 ng/mL de IL-4. Observamos que estas células se caracterizaram pela propriedade de serem não-aderentes, com a presença de dendritos, morfologia arredondada e tamanho inferior em relação aos macrófagos. Por citometria de fluxo, observamos que estas células expressaram níveis elevados de CD11c, CD86 e HLA-DR (Figura 1E).

## 2. Análise do DNA plasmideal purificado

Para verificarmos se a vacina DNA-hsp65 a ser utilizada nos experimentos de estimulação de macrófagos e células dendríticas estava íntegra após sua purificação e se o gene da hsp65 estava inserido no vetor pVAX, amostras da vacina DNA-hsp65 e do vetor pVAX foram digeridas com a enzima *Bam* HI. A digestão da vacina DNA-hsp65 com *Bam* HI provocou a linearização do plasmídeo, revelando uma banda de 6000 pb (Figura 2). Quando digerimos o vetor pVAX com a mesma enzima, observamos a formação de uma banda com aproximadamente 3000 pb (Figura 2). Portanto, o gene da hsp65, com peso molecular de 3000 pb, estava clonado no vetor pVAX. Além disso, após a purificação do plasmídeo, determinamos os níveis de endotoxina presentes nas amostras, com o uso do kit Limulus Amoocyte Lysate Kit QCL-1000 (Cambrex Company, Walkersville, MD). Os níveis de endotoxina detectados estavam dentro dos determinados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) (Docket nº 96N-0400) para vacinas de DNA (menores que 0.1 unidade de endotoxina (UE) / µg DNA).



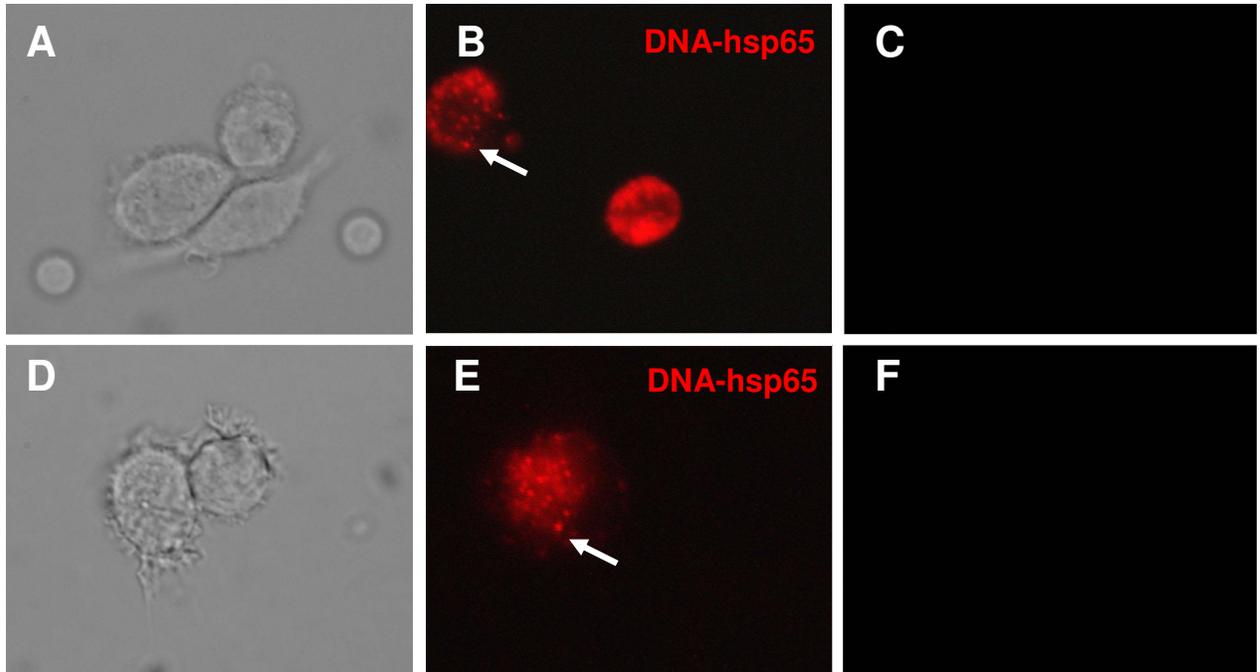
**Figura 1:** Fotomicrografia de microscopia de luz mostrando monócitos de sangue periférico recentemente isolados (A); macrófagos obtidos a partir do cultivo de monócitos com GM-CSF (1 ng/mL) (B) e células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos cultivados com GM-CSF (7 ng/mL) e IL-4 (14 ng/mL) (C). Expressão basal de CD14, CD86 e HLA-DR por macrófagos (D) e de CD11c, CD86 e HLA-DR por células dendríticas (E) analisadas por citometria de fluxo. Resultados apresentados como a média  $\pm$  SEM de quatro culturas de células de diferentes indivíduos.



**Figura 2:** Perfil eletroforético dos plasmídeos DNA-hsp65 e pVAX digeridos com a enzima de restrição *Bam* HI. Os plasmídeos foram incubados durante uma noite, a 37°C, com a enzima *Bam* HI. A eletroforese das amostras foi realizada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Canaleta 1: 1kb PLUS DNA Ladder (Gibco), utilizado como marcador de peso molecular; Canaleta 2: DNA-hsp65; Canaleta 3: vetor pVAX. pb: pares de bases.

### **3. Captura da vacina DNA-hsp65 em solução por macrófagos e células dendríticas humanas**

Para demonstrarmos a capacidade de macrófagos e células dendríticas em endocitar a vacina de DNA, estas células foram cultivadas em presença de DNA-hsp65 marcado com Alexa Fluor por 4 horas e analisadas por microscopia de fluorescência. Este ensaio foi previamente padronizado no CPT-FMRP-USP, e utilizamos a concentração de 2 µg/mL de DNA-hsp65 marcado. As Figuras 3A e 3D mostram os macrófagos e as células dendríticas, respectivamente, observadas em microscopia de campo claro. Nas Figuras 3B (macrófagos) e 3E (células dendríticas) observamos que ambas as populações apresentaram no citoplasma pequenas vesículas fluorescentes caracterizando o DNA endocitado. Observamos nas Figuras 3C e 3F os controles negativos correspondentes aos macrófagos e às células dendríticas, respectivamente, que não foram estimulados. Este resultado sugere que o DNA vacinal está sendo capturado por ambos os tipos de APCs, macrófagos e células dendríticas.



**Figura 3:** Endocitose da vacina DNA-hsp65 por macrófagos e células dendríticas. Fotomicrografia de microscopia de fluorescência mostrando macrófagos (A) e células dendríticas (D) fotografadas em microscopia de campo claro. São mostradas também fotomicrografias de macrófagos (B) e células dendríticas (E) cultivados por 4 horas com a vacina DNA-hsp65 marcada com Alexa Fluor, onde observamos a presença de vesículas endocíticas fluorescentes no citoplasma destas células. As marcações controles, nas quais macrófagos e células dendríticas não foram tratados com o DNA marcado, são mostradas nas fotomicrografias C e F, respectivamente.

#### 4. Determinação da dose da vacina DNA-hsp65

Após termos constatado que macrófagos e células dendríticas foram capazes de capturar a vacina DNA-hsp65, passamos a padronizar a concentração da vacina a ser usada nos experimentos de estimulação das APCs *in vitro*. Macrófagos e células dendríticas foram estimulados com 3 diferentes concentrações da vacina de DNA (2, 10 e 20 µg/mL) por 48 horas.

A Figura 4A mostra as porcentagens de macrófagos e de células dendríticas estimulados ou não com diferentes concentrações da vacina DNA-hsp65 e analisadas por citometria de fluxo. Como controle positivo, as células foram estimuladas com LPS. As células foram selecionadas de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e de granularidade (SSC). Observamos que aproximadamente 18% dos monócitos cultivados em presença de GM-CSF diferenciaram-se em macrófagos. O estímulo de macrófagos com a vacina DNA-hsp65 nas diferentes concentrações ou com o LPS não alterou esta porcentagem (Figura 4A).

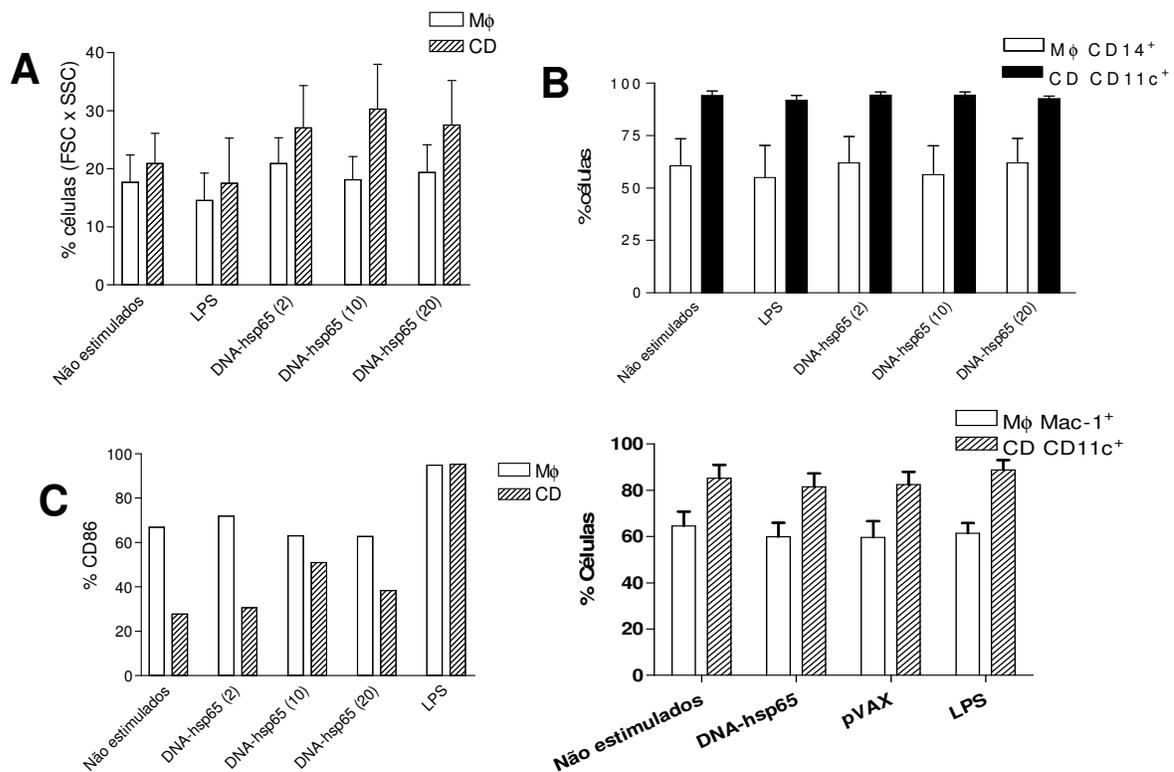
Observamos que aproximadamente 20% dos monócitos cultivados em presença de GM-CSF e IL-4 diferenciaram-se em células dendríticas. A estimulação com as diferentes concentrações da vacina de DNA ou com o LPS não alterou de maneira significativa a porcentagem de células dendríticas em cultura (Figura 4A).

Analisamos também a porcentagem de macrófagos e de células dendríticas que além de apresentarem tamanho e granularidade característicos, também eram positivos para os marcadores CD14 e CD11c, respectivamente. Observamos na Figura 4B que aproximadamente 55% dos macrófagos, estimulados ou não com as diferentes concentrações de DNA-hsp65, eram CD14<sup>+</sup>. Da mesma forma, 95% das células dendríticas eram CD11c<sup>+</sup>, e esta porcentagem se manteve em todos os estímulos usados.

A Figura 4C mostra os resultados de um experimento representativo repetido 4 vezes, no qual macrófagos estimulados com a vacina DNA-hsp65 nas diferentes concentrações apresentaram expressão de CD86 semelhante à observada por macrófagos não estimulados. Verificamos que o estímulo com LPS induziu elevada expressão de CD86 nestas células. Células dendríticas estimuladas com a vacina DNA-hsp65 nas concentrações de 10 e 20 µg/mL apresentaram aumento na expressão de CD86, em relação às células dendríticas que não foram estimuladas. A

partir destes experimentos, definimos que a concentração de 20 µg/mL seria utilizada para avaliar o efeito imunoestimulador da vacina DNA-hsp65 sobre as APCs humanas.

Um marcador muito utilizado para a caracterização de macrófagos é o CD11b, ou Mac-1. Uma vez que padronizamos a dose da vacina DNA-hsp65 a ser utilizada nos ensaios de estimulação de macrófagos e de células dendríticas, caracterizamos novamente estas populações celulares de acordo com a expressão dos marcadores Mac-1 e CD11c, respectivamente. Observamos na Figura 4D que aproximadamente 60% das células com tamanho e granularidade característicos de macrófagos expressaram o marcador Mac-1, enquanto 85% das células com tamanho e granularidade característicos de células dendríticas expressaram o CD11c. A porcentagem de macrófagos e de células dendríticas expressando os respectivos marcadores se manteve após estimulação com DNA-hsp65 ou LPS.

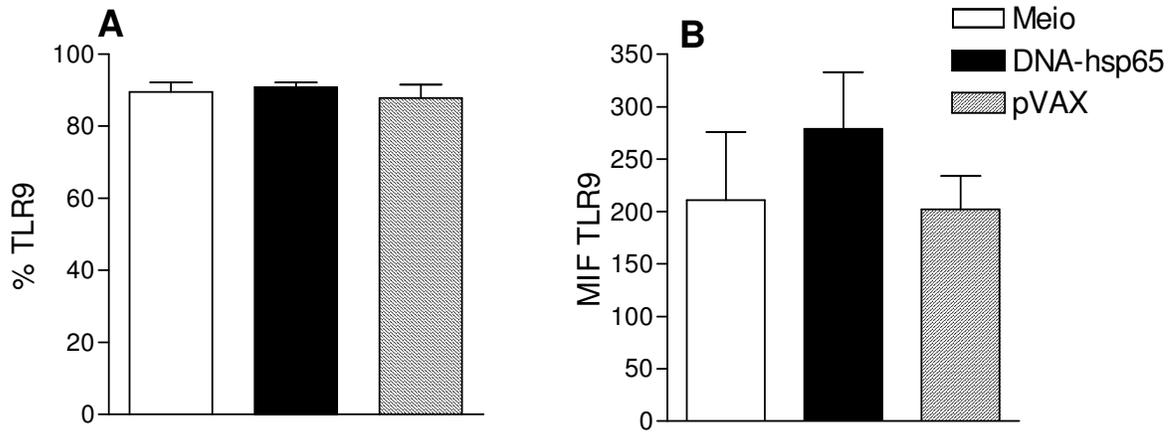


**Figura 4:** Caracterização das culturas de macrófagos e de células dendríticas estimulados com diferentes concentrações da vacina DNA-hsp65. Macrófagos e células dendríticas foram estimulados ou não com DNA-hsp65 em diferentes concentrações (2, 10 e 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 48 horas. As células foram analisadas por citometria de fluxo quanto aos parâmetros de tamanho (FSC) e de granularidade (SSC) (A). Macrófagos e células dendríticas foram analisados quanto à expressão dos marcadores CD14 e CD11c, respectivamente (B). Porcentagem de expressão de CD86 nas diferentes populações de APCs (C). Macrófagos e células dendríticas também foram analisados quanto à expressão do marcador Mac-1 e CD11c, respectivamente (D). Resultados expressos como a média  $\pm$  SEM das culturas de células obtidas de 4-8 indivíduos saudáveis.

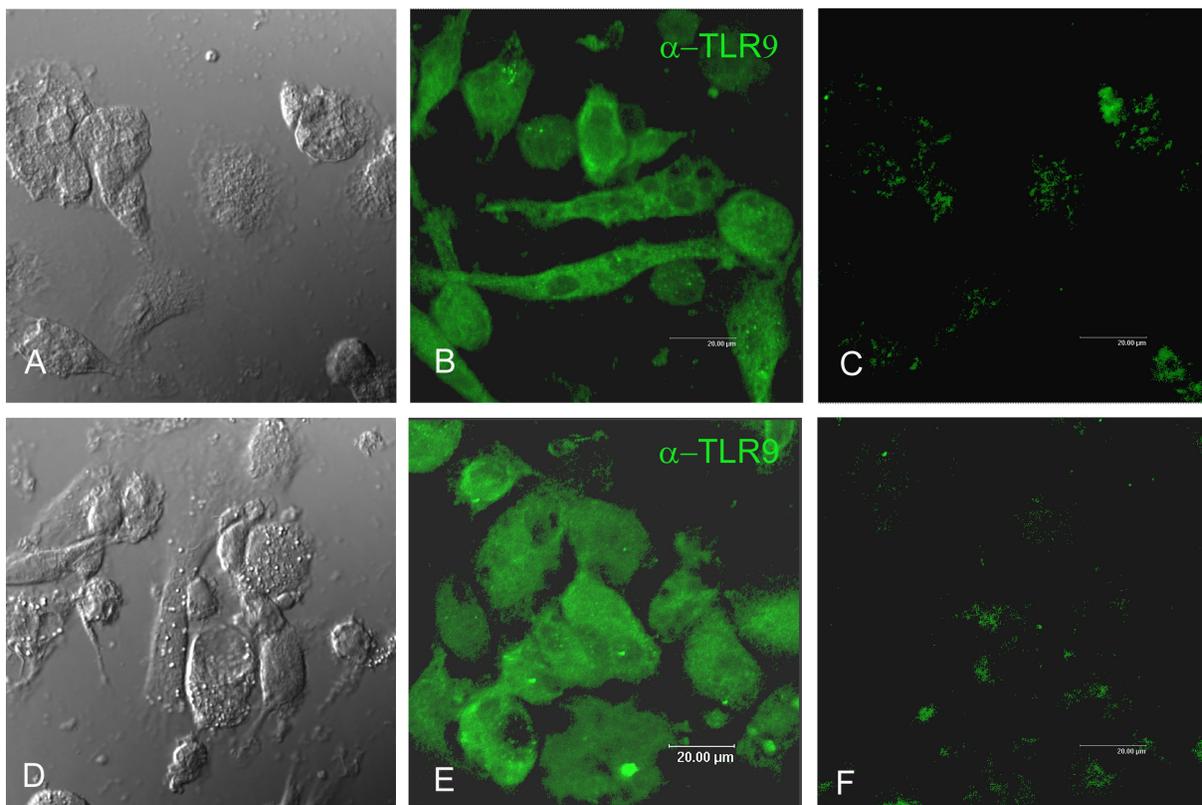
## **5. Análise da expressão de TLR9 em macrófagos e células dendríticas humanas**

A avaliação da expressão intracelular de TLR9 por citometria de fluxo foi realizada apenas em culturas de células dendríticas. Não avaliamos a expressão deste receptor em macrófagos, pois tivemos dificuldades na obtenção destas células durante a realização destes experimentos. A avaliação deste receptor foi realizada em células dendríticas estimuladas ou não com 20 µg/mL de DNA-hsp65 ou com o vetor pVAX. Observamos que a porcentagem de células dendríticas expressando TLR9 intracelular foi muito similar entre as células não estimuladas e aquelas estimuladas com DNA-hsp65 ou com pVAX (Figura 5A). Entretanto, a análise da MIF (mediana da intensidade de fluorescência) mostrou que células estimuladas com a vacina DNA-hsp65 apresentaram modulação positiva na expressão deste receptor, comparada à expressão em células não estimuladas ou estimuladas com o vetor pVAX (Figura 5B), embora esta diferença não tenha sido significativa.

Pelo fato das células dendríticas terem expressado altos níveis de TLR9 intracelular, realizamos novos experimentos para a análise da expressão deste receptor por macrófagos e células dendríticas por microscopia confocal. Observamos que ambas as populações celulares expressaram níveis elevados de TLR9 intracelular. As Figuras 6A e 6D mostram macrófagos e células dendríticas fotografados em microscopia de contraste diferencial. Observamos nas Figuras 6B e 6E uma forte marcação fluorescente dispersa pelo citoplasma de macrófagos e células dendríticas, respectivamente, indicando a presença de TLR9 nos compartimentos intracelulares. As Figuras 6C e 6F mostram o controle negativo para a marcação de macrófagos e células dendríticas, respectivamente, indicando fraca inespecificidade. Este controle foi realizado excluindo-se apenas a etapa de marcação com o anticorpo primário anti-TLR9 humano.



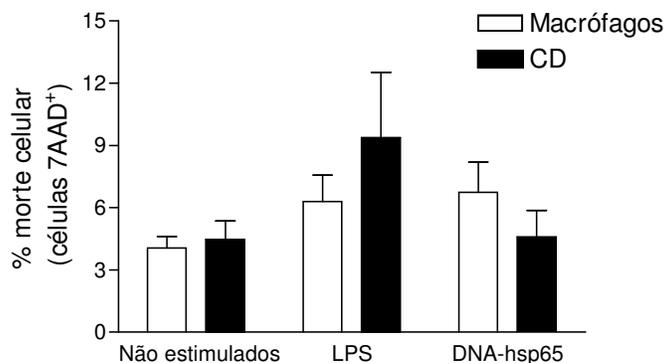
**Figura 5:** Análise por citometria de fluxo da expressão intracelular de TLR9 em células dendríticas humanas. Células dendríticas foram estimuladas ou não com DNA-hsp65 (20 µg/mL) ou com o vetor pVAX (20 µg/mL) por 48 horas, fixadas, permeabilizadas, e então marcadas com anticorpo primário de camundongo anti-TLR9 humano, seguida por marcação secundária com anticorpo biotilado anti-IgG de camundongo. As células foram então incubadas com streptavidina marcada com PE, sendo analisadas por citometria de fluxo. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  SEM da porcentagem de células positivas para TLR9 (A) ou através da mediana da intensidade de fluorescência (MIF) (B) de 5-8 culturas de células dendríticas de diferentes indivíduos saudáveis.



**Figura 6:** Análise por microscopia confocal da expressão intracelular de TLR9 por macrófagos e células dendríticas humanas. Macrófagos e células dendríticas foram fixados e permeabilizados, sendo então marcados com anticorpo primário de camundongo anti-TLR9 humano, seguido por marcação secundária com anticorpo biotilado anti-IgG de camundongo. As células foram então incubadas com streptavidina marcada com Alexa Fluor 488, sendo analisadas por microscopia confocal. Escala correspondente a 20  $\mu$ M. (A) e (D): microscopia de contraste diferencial indicando macrófagos e células dendríticas, respectivamente. (B) e (E): expressão intracelular de TLR9 em macrófagos e células dendríticas, respectivamente. (C) e (F): controle negativo da marcação de TLR9 referente à macrófagos e células dendríticas, respectivamente.

## **6. Avaliação da indução de morte celular por apoptose após estimulação com DNA-hsp65**

Uma vez que definimos as populações celulares de interesse para nosso estudo através dos parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) e dos marcadores específicos Mac-1 e CD11c para populações de macrófagos e de células dendríticas, respectivamente, passamos para a etapa de caracterização do fenótipo celular associado com a ativação destas células. Uma etapa prévia à caracterização funcional dos macrófagos e das células dendríticas humanas estimulados com a vacina DNA-hsp65 foi avaliar se a concentração de 20 µg/mL da vacina de DNA poderia estar induzindo morte celular por apoptose. A Figura 7 mostra que culturas de macrófagos estimulados com DNA-hsp65 apresentaram aproximadamente 6% de morte celular, enquanto nas células não estimuladas foram detectados 4% de apoptose. Culturas de macrófagos estimulados com LPS também apresentaram 6% de células apoptóticas. Quando avaliamos as culturas de células dendríticas, verificamos que a estimulação ou não com a vacina DNA-hsp65 resultou em aproximadamente 4,5% de células apoptóticas, enquanto o estímulo com LPS resultou em 9% de morte celular por apoptose. Observamos resultados semelhantes quando as células foram estimuladas com 2 ou 10 µg/mL da vacina DNA-hsp65 (dados não mostrados).



**Figura 7:** Avaliação da indução de morte celular por apoptose após estimulação com a vacina DNA-hsp65. Macrófagos e células dendríticas foram estimulados com 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  da vacina DNA-hsp65 por 48 horas. Como controle positivo, as células foram estimuladas com LPS. Posteriormente, as células foram marcadas com 7AAD e analisadas por citometria de fluxo quanto à porcentagem de células 7AAD<sup>+</sup>. Resultados expressos como a média  $\pm$  SEM das culturas de células de 4 indivíduos saudáveis.

## 7. Produção de citocinas e quimiocinas por macrófagos e células dendríticas estimulados com DNA-hsp65

Depois de verificarmos que a concentração de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  da vacina DNA-hsp65 a ser utilizada para estimular macrófagos e células dendríticas humanas *in vitro* induzia baixa porcentagem de morte celular, passamos a avaliar o potencial imunoestimulatório da vacina sobre estas APCs. Primeiramente, detectamos a produção das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6, das citocinas que modulam a resposta imune IL-10 e IL-12 e das quimiocinas MCP-1 (proteína quimioatrativa de monócitos) e IP-10 (proteína induzida por IFN- $\gamma$ ) nos sobrenadantes das culturas de macrófagos e de células dendríticas estimulados por 48 horas com a vacina de DNA.

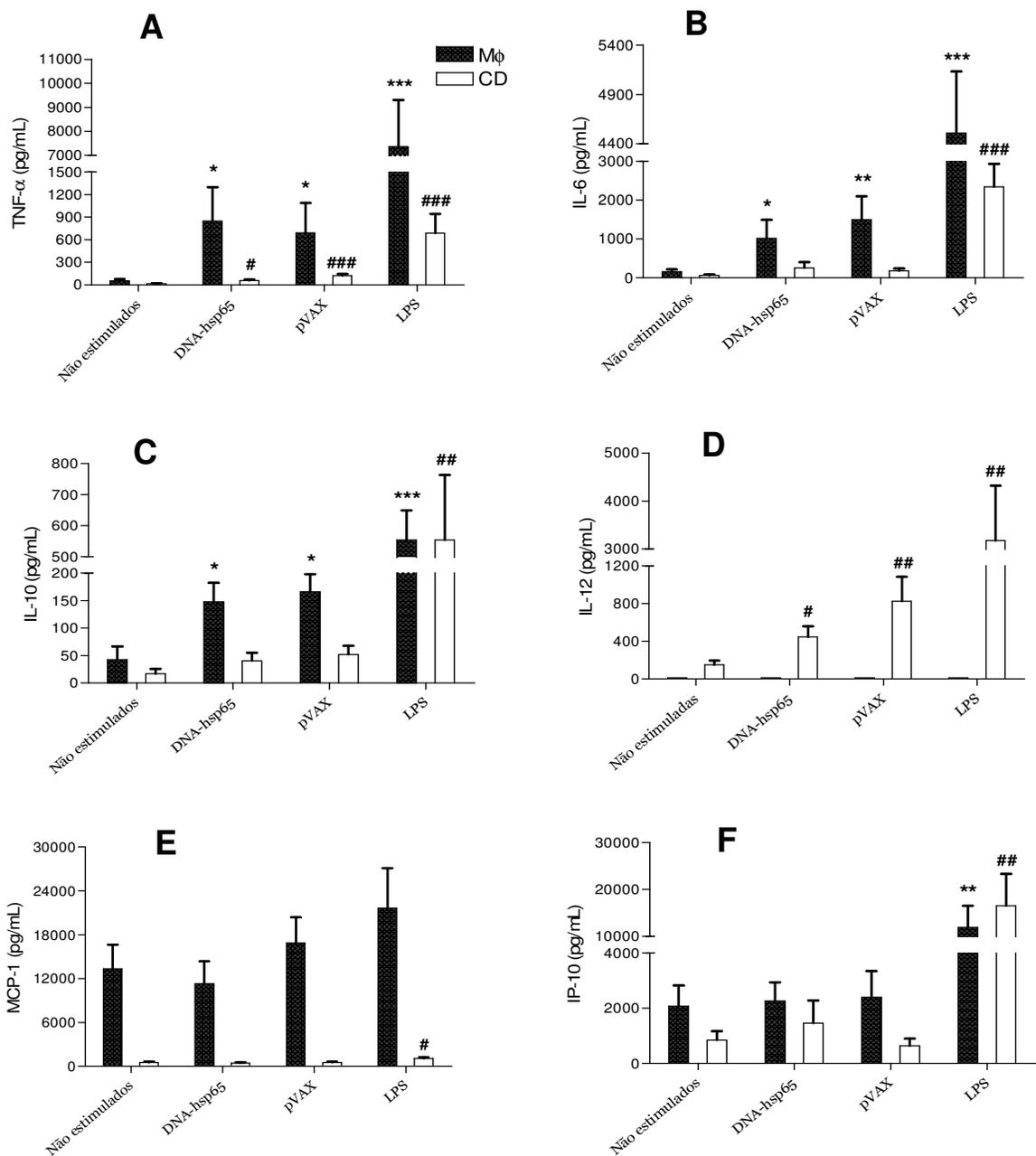
Observamos que a estimulação de macrófagos humanos com a vacina DNA-hsp65 induziu a síntese de concentrações nove vezes maiores de TNF- $\alpha$  e cinco vezes maiores de IL-6, em comparação aos macrófagos que não foram estimulados (Figuras 8A e 8B). Os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 secretados por macrófagos estimulados com DNA-hsp65 foram três vezes maiores em comparação aos de células não estimuladas (Figura 8C). A estimulação com o vetor pVAX

também induziu a síntese de concentrações significativas destas citocinas, similares aos níveis induzidos após a estimulação com DNA-hsp65. O controle positivo usado (LPS) foi eficaz em induzir a produção de concentrações mais elevadas dessas citocinas do que a vacina DNA-hsp65.

Macrófagos estimulados ou não com DNA-hsp65, vetor pVAX ou LPS não produziram IL-12 (IL-12p40 ou IL-12p70). A estimulação de macrófagos humanos, tanto com a vacina DNA-hsp65 quanto com o vetor pVAX, não estimulou a síntese das quimiocinas MCP-1 e IP-10, uma vez que os níveis secretados foram semelhantes aos de macrófagos não estimulados (Figuras 8E e 8F). A estimulação de macrófagos com LPS não induziu a secreção de MCP-1, enquanto este estímulo induziu a síntese de níveis significativos de IP-10 por macrófagos. Porém, os níveis basais destas quimiocinas secretados por células não estimuladas foram elevados.

Com relação às células dendríticas, observamos que após estimulação com a vacina DNA-hsp65, houve secreção de concentrações significativas de TNF- $\alpha$ , em relação às células não estimuladas. O vetor pVAX foi mais eficiente que a vacina em induzir a síntese desta citocina por células dendríticas (Figura 8A). Notamos que os níveis de TNF- $\alpha$  secretados por células dendríticas estimuladas com DNA-hsp65 foram bastante inferiores em relação aos níveis desta citocina produzidos por macrófagos sob o mesmo estímulo.

Com exceção ao LPS, os estímulos DNA-hsp65 e vetor pVAX foram incapazes de aumentar a secreção de IL-6 e IL-10 por células dendríticas (Figuras 8B e 8C). Diferente do que foi observado em culturas de macrófagos, culturas de células dendríticas estimuladas com a vacina DNA-hsp65 secretaram níveis duas vezes maiores de IL-12p40 em relação às células não estimuladas. O estímulo com o vetor pVAX induziu a síntese de concentrações quatro vezes maiores de IL-12p40 em relação às células não estimuladas (Figura 8D). A citocina IL-12p70 também foi avaliada, porém, não obtivemos níveis detectáveis pelo ensaio. Observamos também que a estimulação de células dendríticas tanto com a vacina DNA-hsp65 quanto com o vetor pVAX não induziu a secreção de MCP-1 e IP-10. A modulação na síntese destas quimiocinas foi observada somente após a estimulação de células dendríticas com LPS (Figuras 8E e 8F).



**Figura 8:** Produção de citocinas e quimiocinas por macrófagos e células dendríticas humanas estimulados com DNA-hsp65. Macrófagos e células dendríticas foram estimulados ou não durante 48 horas com DNA-hsp65 (20  $\mu$ g/mL), com o vetor pVAX (20  $\mu$ g/mL) ou com LPS (500 ng/mL) e avaliados quanto à produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-12p40, e das quimiocinas MCP-1 e IP-10. Resultados expressos como a média  $\pm$  SEM da produção de citocinas detectadas em 6-8 culturas de macrófagos e 7-10 culturas de células dendríticas de indivíduos saudáveis. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ , em relação a macrófagos não estimulados; #  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$ , em relação a células dendríticas não estimuladas.

## 8. Expressão de marcadores de ativação em macrófagos e células dendríticas estimulados com DNA-hsp65

Além de avaliarmos a produção de citocinas e quimiocinas por macrófagos e células dendríticas estimuladas com a vacina DNA-hsp65, estudamos também o fenótipo associado com a ativação dessas APCs, através da análise da expressão de marcadores de superfície. Os marcadores de superfície estudados foram os receptores CD80 e CD86 (moléculas coestimulatórias B7.1 e B7.2, respectivamente), a molécula HLA-DR (molécula de classe II do MHC), e no caso específico de células dendríticas, o receptor CD83 (caracterizado como marcador de maturação desta população celular). Verificamos que macrófagos e células dendríticas diferenciados *in vitro* apresentaram elevada expressão constitutiva da molécula HLA-DR. Neste caso, a análise desta molécula foi expressa como MIF (mediana da intensidade de fluorescência) na tentativa de avaliar alteração na densidade da mesma na superfície das referidas APCs em cultura frente aos diferentes estímulos estudados. Com relação à expressão de CD80, CD86 e CD83, avaliamos tanto a porcentagem de células (macrófagos e células dendríticas) expressando estes receptores, quanto a MIF. Na análise da expressão das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 também verificamos que macrófagos e células dendríticas expressaram ambas as moléculas constitutivamente. No entanto, a expressão não ocorreu na totalidade das células em cultura, o que conferiu a estas moléculas um padrão de expressão bimodal. Nesta situação, o aumento tanto na porcentagem de células dendríticas ou macrófagos expressando CD80 ou CD86, quanto na MIF, podem ser interpretadas como modulação positiva na expressão do receptor devido ao deslocamento do histograma na escala log de fluorescência. Para o receptor CD83, como a molécula passa a ser induzida após estimulação *in vitro*, assumindo distribuição bimodal também, a interpretação da expressão desta molécula é semelhante à dos receptores CD80 e CD86.

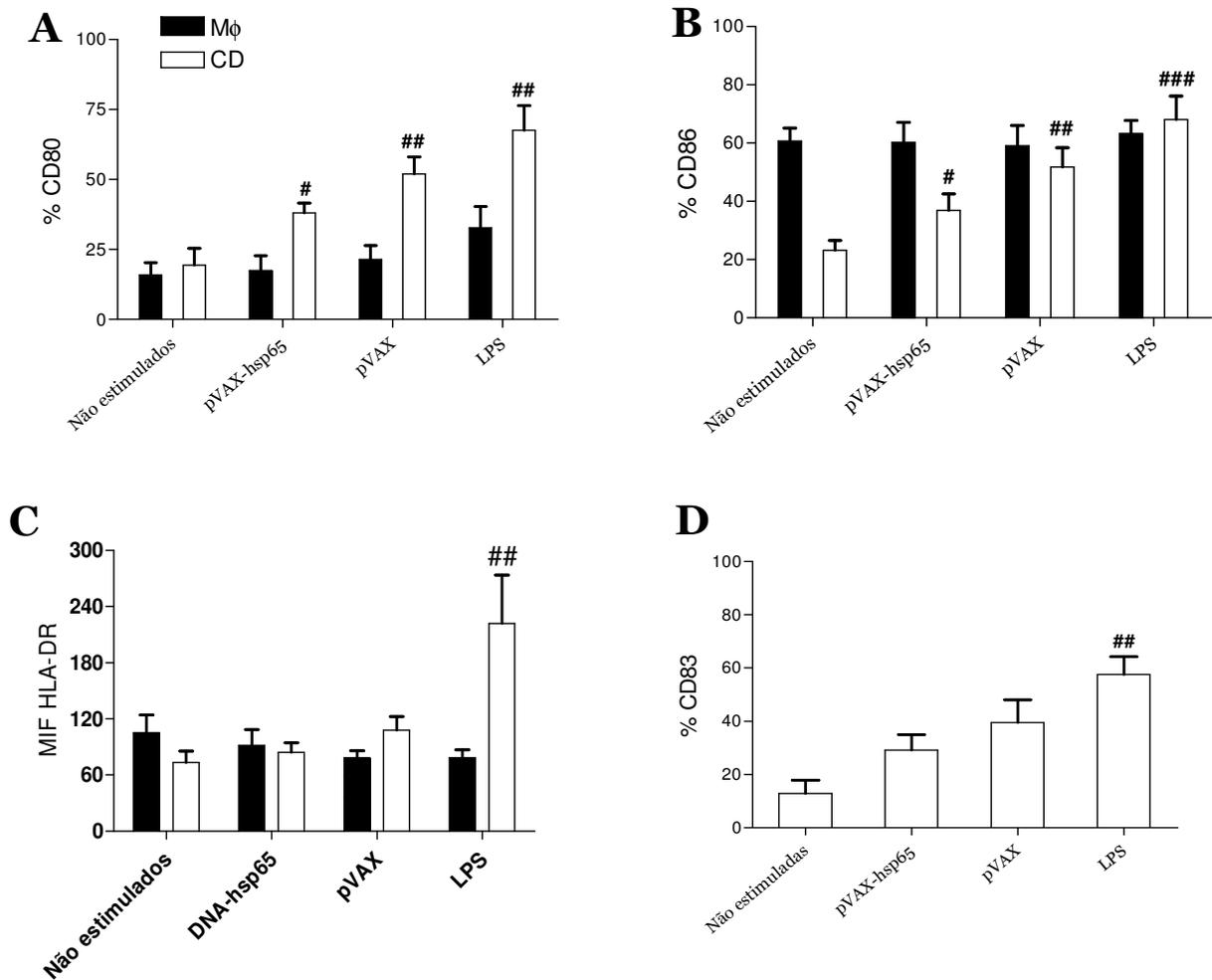
Observamos que não houve modulação positiva na expressão de CD80 e CD86 na superfície de macrófagos humanos estimulados com DNA-hsp65 ou com o vetor pVAX no que se refere à porcentagem de células expressando estes marcadores, quando comparada à porcentagem de expressão em células não estimuladas (Figuras 9A e B). Por outro lado, a estimulação com LPS regulou positivamente a expressão de CD80 em macrófagos, porém, não encontramos

diferença estatística em relação às células não estimuladas. Observamos que a expressão basal de CD86 na superfície de macrófagos foi elevada. A expressão destes marcadores também foi avaliada através da MIF, porém não observamos diferenças frente aos estímulos avaliados.

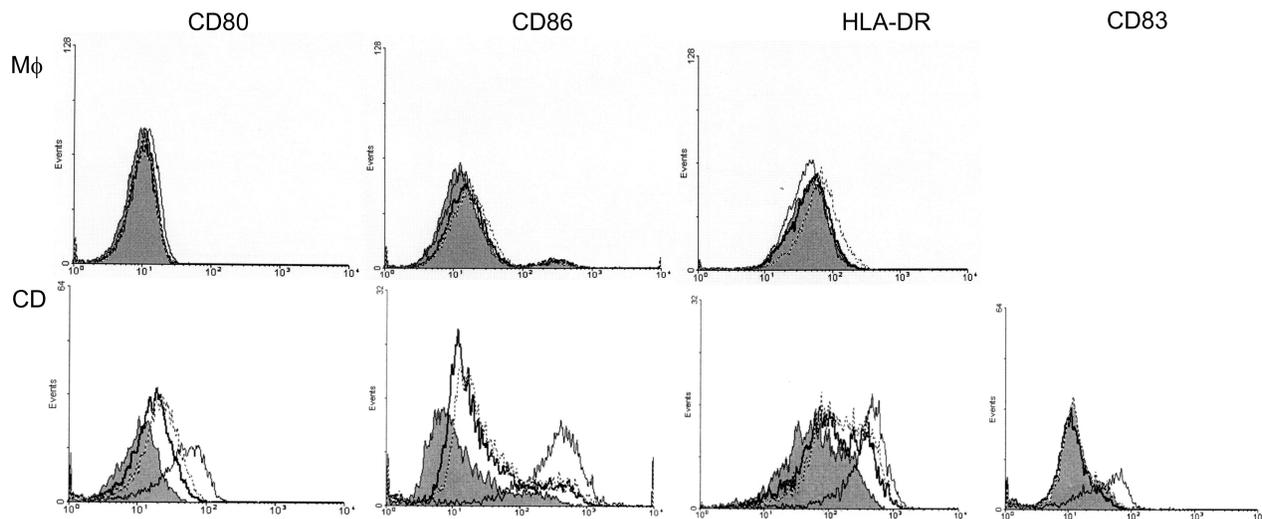
Células dendríticas estimuladas com a vacina DNA-hsp65 ou com o vetor pVAX apresentaram modulação positiva significativa na expressão de CD80 e CD86 comparada à de células não estimuladas (Figuras 9A e 9B). Células dendríticas estimuladas tanto com DNA-hsp65 quanto com o vetor pVAX foram capazes de modular positivamente a expressão de CD83. No entanto, não verificamos diferença estatisticamente significativa, como foi observada em relação ao estímulo com LPS (Figura 9D). Quando analisamos a expressão destes marcadores pela MIF, verificamos a expressão similar de CD80, CD86 e CD83 frente aos diferentes estímulos. Entretanto, a expressão de CD86 foi modulada positivamente após estimulação com LPS (dados não mostrados).

Observamos uma elevada expressão constitutiva tanto por macrófagos quanto por células dendríticas de HLA-DR. A estimulação com DNA-hsp65 ou com o vetor pVAX não alterou a expressão desta molécula na superfície destas APCs. O LPS modulou significativamente a expressão de HLA-DR na superfície de células dendríticas, enquanto o mesmo efeito não foi observado em culturas de macrófagos (Figura 9C).

A Figura 10 mostra um experimento representativo referente à expressão dos receptores descritos acima, onde os resultados foram expressos na forma de histogramas.



**Figura 9:** Expressão de marcadores de superfície associados com ativação celular em macrófagos e células dendríticas estimulados com DNA-hsp65. Macrófagos e células dendríticas foram estimulados ou não durante 48 horas com DNA-hsp65 (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), com o vetor pVAX (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou com LPS (500  $\text{ng}/\text{mL}$ ) e avaliados por citometria de fluxo quanto à expressão das moléculas CD80, CD86, HLA-DR e CD83. Resultados expressos como a média  $\pm$  SEM da porcentagem de células expressando CD80, CD86 ou CD83 ou da MIF de HLA-DR obtidos em 11 culturas de macrófagos e 7-9 culturas de células dendríticas de indivíduos saudáveis. #  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$ , em relação a células dendríticas não estimuladas.



**Figura 10:** Expressão de marcadores de superfície associados com ativação celular em macrófagos e células dendríticas humanas estimulados ou não com a vacina DNA-hsp65. Resultados expressos em histogramas referentes a um experimento representativo. Histograma cinza= células não estimuladas; linha preta= DNA-hsp65; linhas pontilhadas= pVAX; linha cinza= LPS.

### 9. Ativação de linfócitos T alogenêicos por macrófagos e células dendríticas previamente estimulados com DNA-hsp65

Uma outra forma de avaliarmos o papel imunoestimulador da vacina DNA-hsp65 sobre macrófagos e células dendríticas humanas foi através do estudo da ativação inespecífica de linfócitos T promovida por estas APCs em reação mista de leucócitos (MLR, do inglês *Mixed Leukocyte Reaction*).

A Figura 11 mostra os resultados referentes a 1 experimento representativo repetido 2 vezes. Verificamos que macrófagos e células dendríticas previamente estimulados com a vacina DNA-hsp65, ao serem colocados em contato com linfócitos T CD4<sup>+</sup> alogenêicos, induziram maior proliferação que a detectada por células TCD4<sup>+</sup> que foram cultivadas com macrófagos e células dendríticas que não receberam estimulação prévia (não estimuladas) (Figura 11). A pré-estimulação de macrófagos com o vetor pVAX induziu proliferação semelhante à detectada por linfócitos T CD4<sup>+</sup> colocados em contato com macrófagos não estimulados, enquanto células dendríticas previamente estimuladas com o vetor pVAX induziram maior proliferação em linfócitos T CD4<sup>+</sup>, em relação àquela induzida por células dendríticas que não foram previamente estimuladas. Como controle positivo do experimento,

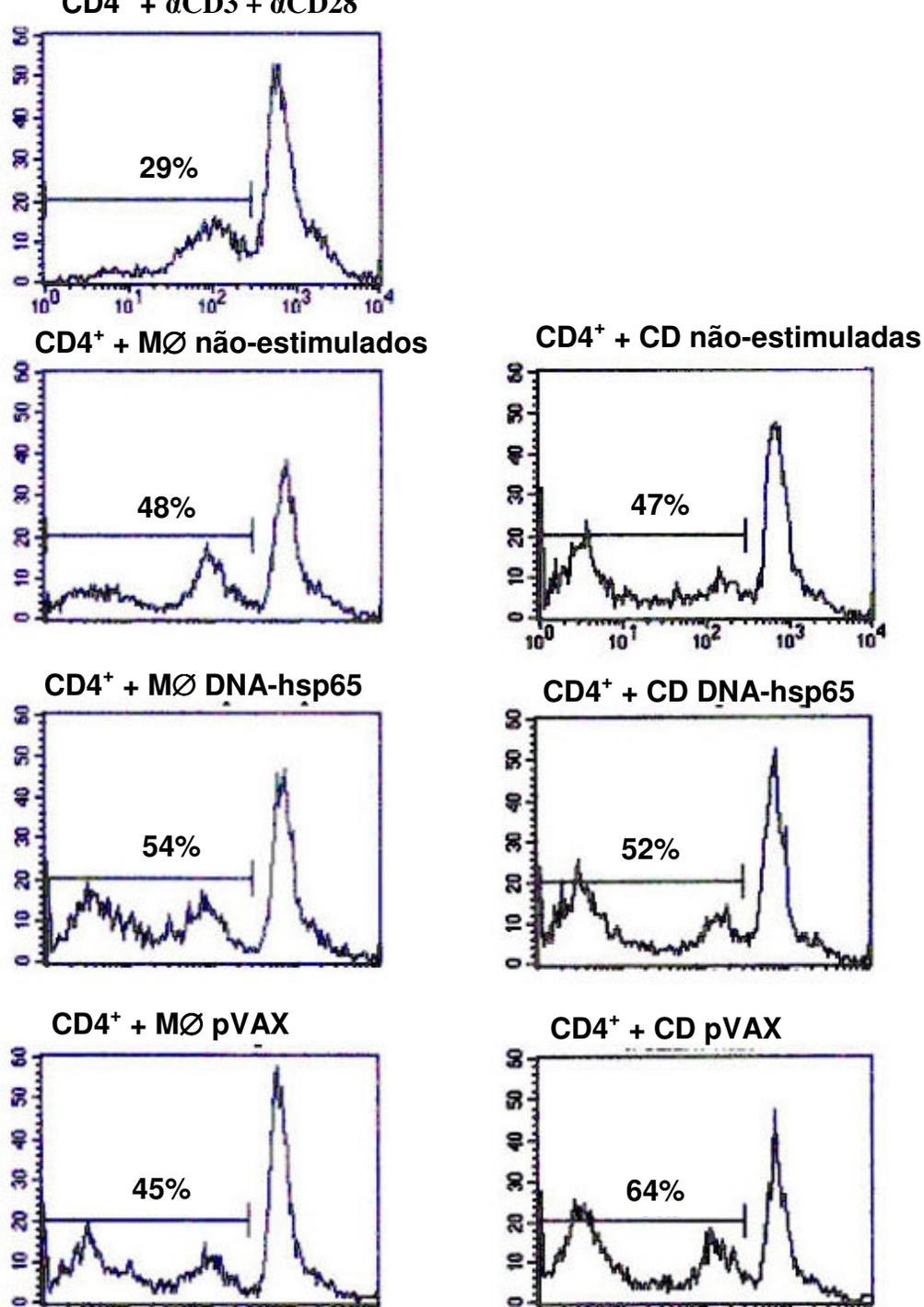
linfócitos T CD4<sup>+</sup> foram estimulados com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28. A proliferação observada por estas células foi menor, em relação à proliferação detectada na MLR (Figura 11).

Paralelamente, avaliamos a secreção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-5 por linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> cultivados em presença dos sobrenadantes de culturas de macrófagos e de células dendríticas que foram estimulados ou não com a vacina DNA-hsp65. Antes dos linfócitos T serem colocados em presença dos sobrenadantes, as células foram estimuladas com anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD28, juntamente com IL-2. Os sobrenadantes utilizados foram obtidos de 3 culturas de macrófagos e células dendríticas selecionados de acordo com os níveis de IL-12 e IL-10 secretados.

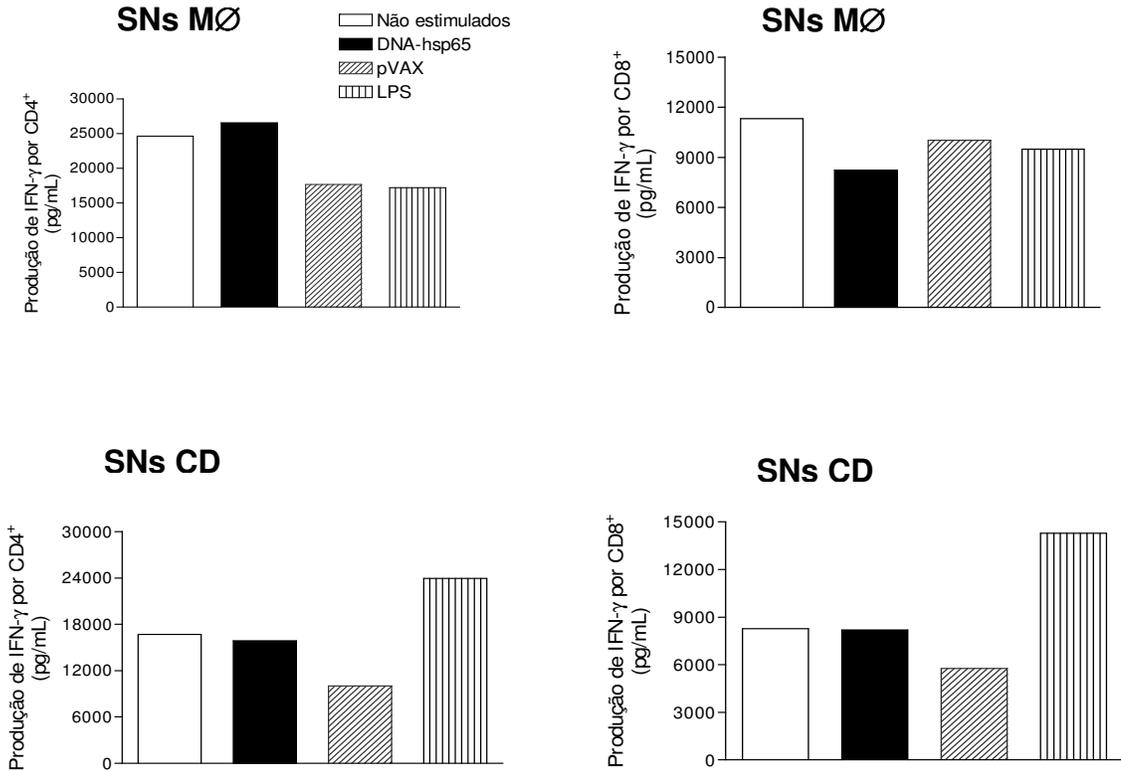
A Figura 12 mostra que a ativação prévia de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> com anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD28, seguida da adição de IL-2 e, posteriormente, a adição dos sobrenadantes de macrófagos ou de células dendríticas cultivadas ou não com DNA-hsp65, induziu a secreção de altos níveis de IFN- $\gamma$ . Os sobrenadantes de culturas de macrófagos estimulados com DNA-hsp65 induziu um aumento de aproximadamente 2000 pg/mL na produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos TCD4<sup>+</sup> e não alterou a produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos TCD8<sup>+</sup> em relação ao sobrenadante de culturas de macrófagos que não foram estimulados. Sobrenadantes obtidos de culturas de macrófagos previamente estimulados com LPS induziram a secreção de baixos níveis de IFN- $\gamma$  por células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> em relação à estimulação com sobrenadantes de células não estimuladas.

Com relação aos sobrenadantes obtidos de culturas de células dendríticas com os diferentes estímulos verificamos que os sobrenadantes coletados após estimulação com LPS foram capazes de induzir a secreção de altos níveis de IFN- $\gamma$  por células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. A secreção de IFN- $\gamma$  por linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> estimulados com sobrenadantes de macrófagos ou células dendríticas estimulados com pVAX foi inferior em relação à estimulação de linfócitos com sobrenadantes de células não estimuladas. Os sobrenadantes de células dendríticas estimuladas com DNA-hsp65 induziram níveis de IFN- $\gamma$  similares aos induzidos por sobrenadantes de células não estimuladas (Figura 12). Níveis basais de IL-5 foram secretados por linfócitos após a estimulação policlonal. Os sobrenadantes obtidos de culturas de

macrófagos e de células dendríticas previamente estimulados com DNA-hsp65, vetor pVAX ou LPS não afetaram a síntese de IL-5 por células T (dados não mostrados).



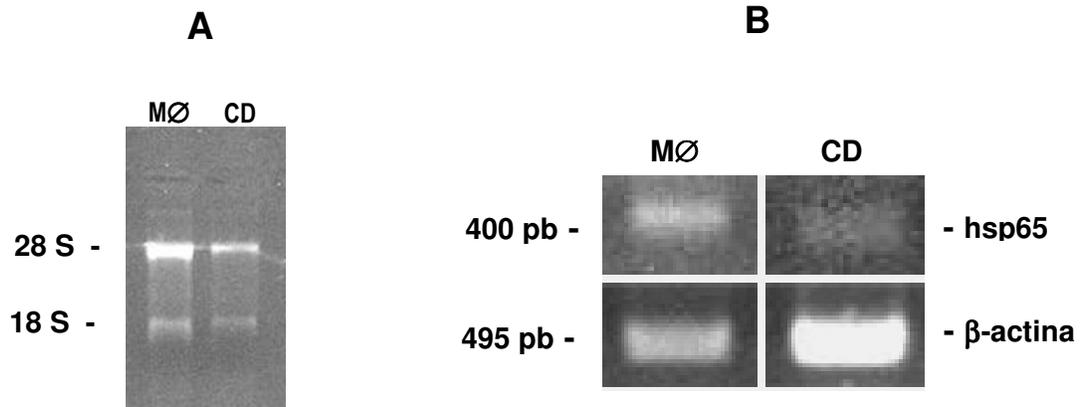
**Figura 11:** Proliferação de linfócitos TCD4<sup>+</sup> em MLR induzida por macrófagos ou células dendríticas previamente estimulados ou não com DNA-hsp65. Células TCD4<sup>+</sup> (respondedoras) foram purificadas, marcadas com CFSE e cultivadas em presença de macrófagos ou células dendríticas (estimuladoras) previamente estimuladas ou não com DNA-hsp65 ou pVAX. Como controle positivo, células TCD4<sup>+</sup> foram estimuladas com anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD28. Após 5 dias, a marcação das células com CFSE foi analisada por citometria de fluxo.



**Figura 12:** Produção de IFN- $\gamma$  por células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> em presença de sobrenadantes obtidos de culturas de macrófagos e células dendríticas. Células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> foram purificadas e pré-estimuladas com anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD28, juntamente com IL-2. As células foram então incubadas com sobrenadantes coletados de culturas de macrófagos (SNs MØ) e células dendríticas (SNs CD) previamente estimuladas ou não com DNA-hsp65, pVAX ou LPS. Resultados mostram os dados referentes a um experimento representativo, repetido 2 vezes.

## **10. Detecção do RNAm para hsp65 em macrófagos e células dendríticas humanas**

Depois de verificarmos que macrófagos e células dendríticas capturaram a vacina DNA-hsp65 em solução e que este estímulo induzia a ativação destas células, nosso próximo objetivo foi analisar se as APCs estimuladas com DNA-hsp65 eram capazes de transcrever o gene que codifica a proteína de choque térmico de 65 kDa (hsp65). Para isso, macrófagos e células dendríticas humanas foram estimulados com 50 µg/mL da vacina DNA-hsp65 por 96 horas. O RNA total foi extraído das culturas de macrófagos e de células dendríticas, e analisado quanto a sua integridade através da detecção dos RNAs ribossômicos 28 S e 18 S em gel de agarose (Figura 13A). Uma característica importante de um RNA íntegro é a proporção de 2:1 entre as subunidades 28 S e 18 S. Verificamos que a proporção dos RNAs extraídos de culturas de macrófagos e células dendríticas foi próxima a 2:1, indicando que o RNA estava íntegro. Observamos que tanto macrófagos quanto células dendríticas foram capazes de transcrever o gene da hsp65 (Figura 13B), embora o resultado seja mais evidente para macrófagos. A transcrição do gene só foi eficaz quando as células foram estimuladas com a dose de 50 µg/mL de DNA-hsp65 e por um período superior a 48 horas, que nesse caso, correspondeu a 96 horas, uma vez que não observamos transcrição quando as células foram estimuladas com 20 µg/mL durante 48 horas (dados não mostrados).



**Figura 13:** Expressão do RNAm para hsp65 por macrófagos e células dendríticas estimulados com DNA-hsp65. Macrófagos e células dendríticas foram estimulados por 96 horas com 50  $\mu\text{g/mL}$  de DNA-hsp65. O RNA total foi extraído e avaliado quanto: (A) Integridade do RNA extraído de culturas de macrófagos e células dendríticas através de eletroforese em gel de agarose 1,5% denaturante. (B) Mensagem para o gene hsp65 através de RT-PCR.

## 11. Avaliação da indução de morte celular por apoptose após estimulação com PFC

Além de avaliarmos o potencial imunestimulatório da vacina DNA-hsp65 sobre macrófagos e células dendríticas humanas, avaliamos também a capacidade das proteínas secretadas por *M. tuberculosis*, descritas como CFP (CFP, do inglês *Culture Filtrate Proteins*) em estimular estas APCs. Em nosso trabalho, usaremos a descrição PFC para proteínas do filtrado de cultura de *M. tuberculosis*. Inicialmente, macrófagos e células dendríticas foram estimulados por 48 horas com duas concentrações distintas de PFC (2,5 e 10  $\mu\text{g/mL}$ ) com a finalidade de verificarmos se estes antígenos induziam morte celular por apoptose. Adicionalmente, utilizamos PFC acrescido de oligodeoxinucleotídeos CpG sintéticos (CpG-ODN).

A Figura 14 mostra os resultados de um experimento representativo repetido duas vezes para macrófagos e cinco vezes para células dendríticas. Observamos que culturas de macrófagos estimuladas com 2,5  $\mu\text{g/mL}$  de PFC apresentaram 7%

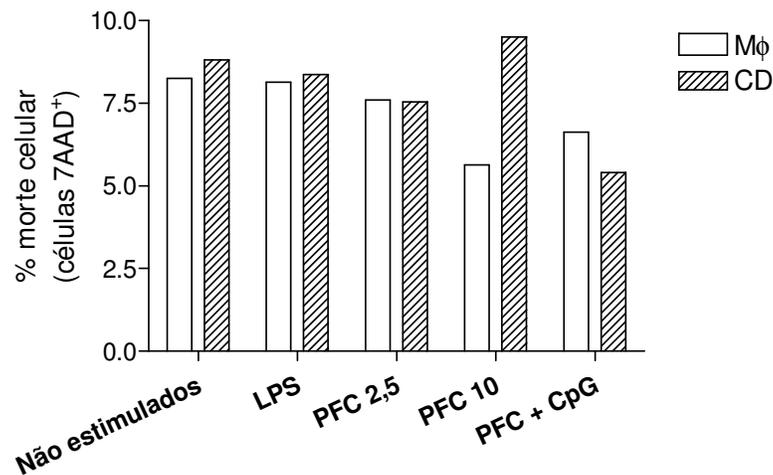
de células apoptóticas, enquanto a estimulação com 10 µg/mL de PFC resultou em 5% de células em apoptose. Culturas de macrófagos não estimulados ou estimulados com LPS apresentaram 8% de células em apoptose. A adição de CpG-ODN à solução de PFC induziu 6,5% de células apoptóticas nas culturas de macrófagos.

Com relação às células dendríticas, as culturas destas APCs estimuladas com 2,5 µg/mL de PFC apresentaram 7% de células em apoptose, enquanto a estimulação com 10 µg/mL de PFC induziu 9,5% de apoptose (Figura 14). Culturas de células dendríticas não estimuladas ou estimuladas com LPS apresentaram 8% de apoptose. A adição de CpG-ODN à solução de PFC reduziu para 5% a porcentagem de células dendríticas apoptóticas nas culturas analisadas. Não encontramos diferenças significativas entre os níveis de apoptose induzidos pelos estímulos com PFC e os níveis detectados em culturas de células dendríticas não estimuladas.

## **12. Produção de citocinas e quimiocinas por macrófagos e células dendríticas estimulados com PFC**

Como o estímulo PFC ou PFC acrescido de CpG-ODN induziu porcentagem de morte celular similar ao controle (células não estimuladas), passamos a avaliar o potencial imunoestimulatório destas proteínas sobre as APCs. A produção de citocinas por macrófagos e células dendríticas foi avaliada 48 horas após o estímulo com 2,5 ou 10 µg/mL de PFC e com PFC (5 µg/mL) acrescido de CpG-ODN (20 µg/mL). Como controle positivo de ativação as células foram estimuladas com LPS (500 ng/mL).

A avaliação da produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos foi realizada em apenas 2 culturas e portanto, não aplicamos testes estatísticos. Observamos que a estimulação destas células com 2,5 µg/mL e 10 µg/mL de PFC aumentou cinco e quinze vezes, respectivamente, a síntese de TNF- $\alpha$  em relação às células não estimuladas. O acréscimo de CpG-ODN ao PFC estimulou níveis de TNF- $\alpha$  8 vezes maiores em relação à células não estimuladas (Figura 15A).



**Figura 14:** Avaliação da indução de morte celular por apoptose após estimulação com PFC. Macrófagos e células dendríticas foram estimulados ou não com 2,5 ou 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PFC, ou com PFC (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) acrescido de CpG-ODN (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 48 horas. Como controle positivo, as células foram estimuladas com LPS. Posteriormente, as células foram marcadas com 7AAD e analisadas por citometria de fluxo quanto à porcentagem de células 7AAD<sup>+</sup>. Resultado de um experimento representativo repetido duas vezes para macrófagos e cinco vezes para células dendríticas.

Células dendríticas estimuladas com 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PFC ou com PFC acrescido de CpG-ODN produziram concentrações duas vezes maiores de TNF- $\alpha$  em relação às células que não foram estimuladas (Figura 15A), resultando em níveis similares àqueles detectados após a estimulação com LPS.

Macrófagos estimulados com PFC apenas ou com PFC acrescido de CpG-ODN produziram concentrações maiores de IL-6 em comparação aos macrófagos que não foram estimulados, apesar desta diferença não ter sido significativa. Estes estímulos também foram eficientes em induzir aumento na síntese desta citocina por células dendríticas, embora as diferenças também não tenham sido significativas (Figura 15B).

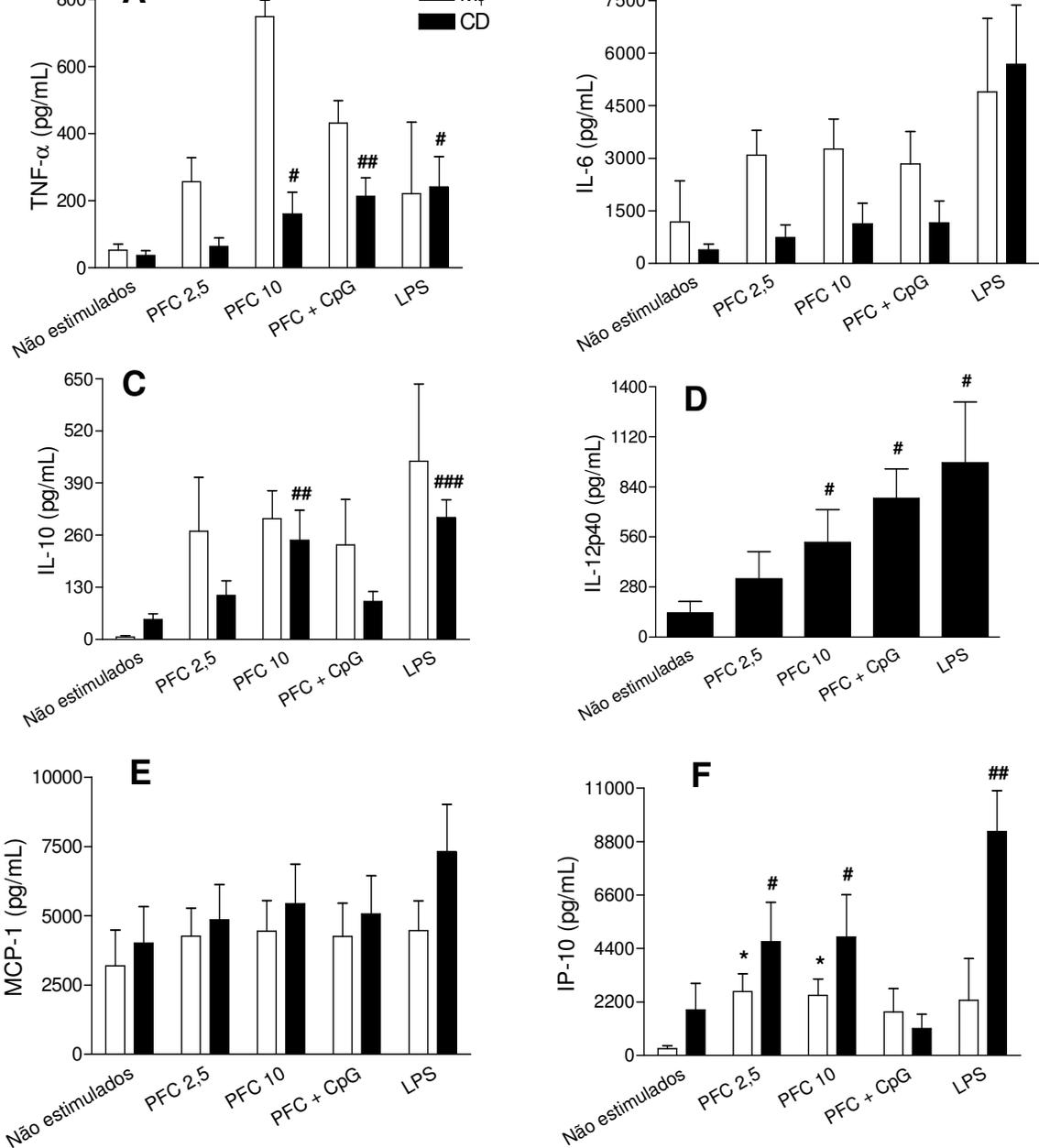
A estimulação de macrófagos com PFC, acrescido ou não de CpG-ODN, também aumentou, embora não significativamente, a secreção da citocina anti-

inflamatória IL-10 (Figura 15C). Células dendríticas estimuladas com 10 µg/mL de PFC secretaram concentrações quatro vezes maiores de IL-10, em relação às células dendríticas que não foram estimuladas (Figura 15C). O antígeno PFC na concentração de 2,5 µg/mL ou acrescido de CpG-ODN estimulou a produção de níveis similares de IL-10 àqueles produzidos por células dendríticas não estimuladas.

Não observamos a produção de IL-12 (IL-12p40 ou IL-12p70) por macrófagos estimulados com o PFC. Em contrapartida, células dendríticas estimuladas com 10 µg/mL de PFC ou com PFC acrescido de CpG-ODN secretaram níveis quatro vezes e cinco vezes maiores, respectivamente, de IL-12p40 em relação às células que não foram estimuladas (Figura 15D). O LPS estimulou a secreção de níveis 7 vezes maiores de IL-12p40 em relação aos detectados por células não estimuladas. Não detectamos a síntese de IL-12p70 por células dendríticas estimuladas com PFC.

Além da secreção das citocinas descritas acima, também detectamos a produção das quimiocinas MCP-1 e IP-10. Os níveis basais da quimiocina MCP-1 secretados por macrófagos e por células dendríticas foram muito elevados. Independente do estímulo utilizado os níveis de MCP-1 detectados por macrófagos e células dendríticas foram similares aos detectados em células não estimuladas (Figura 15E).

Em relação à produção de IP-10, observamos que macrófagos estimulados com PFC nas concentrações de 2,5 ou 10 µg/mL secretaram níveis 9 vezes maiores desta quimiocina quando comparados aos de macrófagos que não foram estimulados (Figura 15F). O acréscimo de CpG-ODN à solução de PFC também induziu aumento da secreção de IP-10, porém não observamos diferença significativa. Quando avaliamos a produção de IP-10 por células dendríticas, verificamos que as células estimuladas com PFC nas concentrações de 2,5 ou 10 µg/mL secretaram níveis duas vezes maiores de IP-10 em relação às células dendríticas não estimuladas (Figura 15F). Porém, o acréscimo de CpG-ODN ao antígeno PFC não alterou a produção desta quimiocina por células dendríticas. O estímulo de células dendríticas com LPS induziu a secreção de níveis de IP-10 4 vezes maiores em relação aos níveis detectados em células não estimuladas.



**Figura 15:** Produção de citocinas e quimiocinas por macrófagos e células dendríticas humanas estimulados com PFC. Macrófagos e células dendríticas foram estimulados ou não durante 48 horas com PFC a 2,5 ou 10  $\mu\text{g/mL}$ , ou com PFC (5  $\mu\text{g/mL}$ ) acrescido de CpG-ODN (20  $\mu\text{g/mL}$ ). Como controle positivo, as células foram estimuladas com LPS (500  $\text{ng/mL}$ ). As células foram avaliadas quanto à produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-12p40, e das quimiocinas MCP-1 e IP-10. Resultados expressos como a média  $\pm$  SEM da produção de citocinas detectadas em 2-5 culturas de macrófagos e 7-8 culturas de células dendríticas de indivíduos saudáveis. \*  $p < 0.05$ , em relação a macrófagos não estimulados; #  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$ , em relação a células dendríticas não estimuladas.

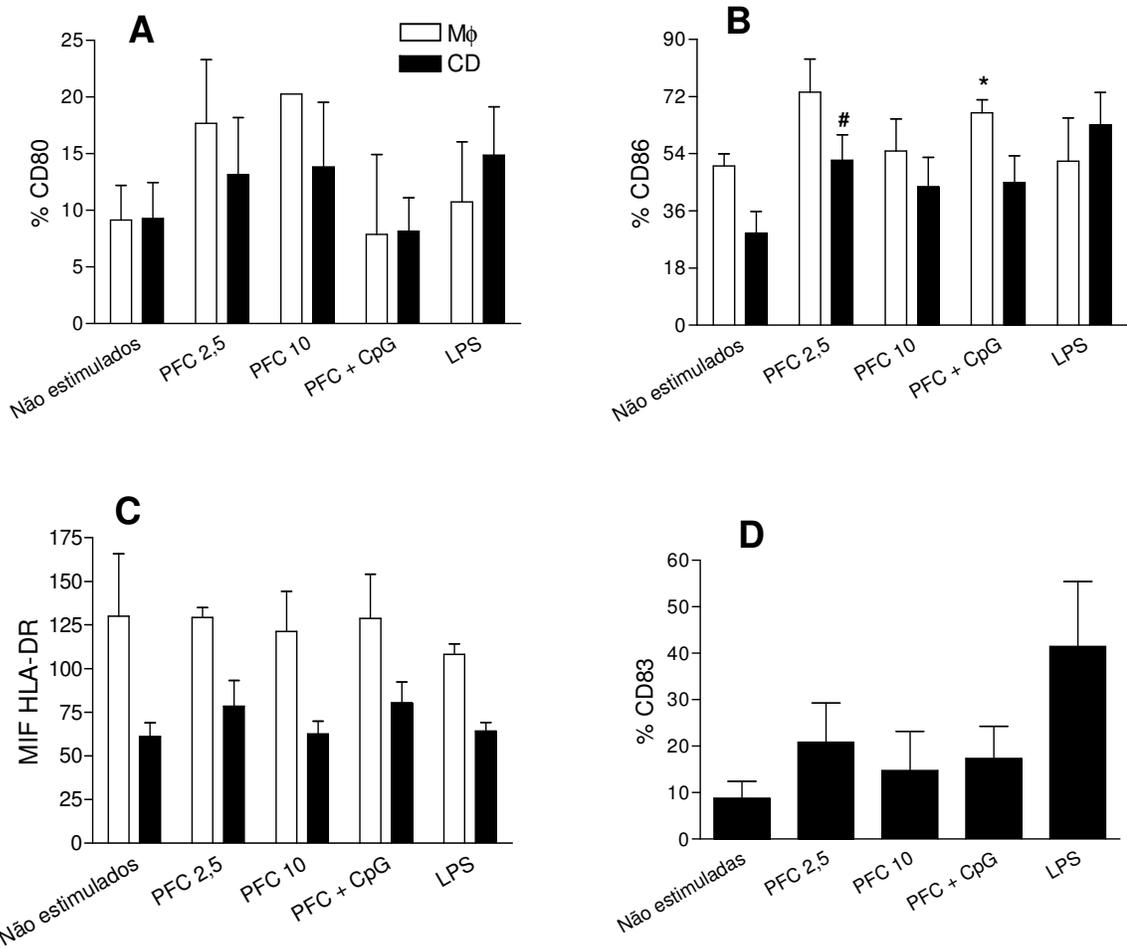
### **13. Expressão de marcadores de ativação em macrófagos e células dendríticas estimulados com PFC**

Para complementar o estudo referente à capacidade imunoestimulatória do antígeno PFC, analisamos também o fenótipo associado com a ativação de macrófagos e células dendríticas. Observamos que tanto o antígeno PFC utilizado nas diferentes concentrações ou acrescido de CpG-ODN, quanto o LPS, não modularam significativamente a expressão de CD80 na superfície de macrófagos ou de células dendríticas em relação à expressão detectada em células não estimuladas (Figura 16A).

Quando analisamos a expressão de CD86, verificamos um aumento na porcentagem de macrófagos expressando CD86 após a estimulação com 2,5 µg/mL de PFC, embora não significativo. A expressão desta molécula em macrófagos estimulados com 10 µg/mL de PFC foi similar à expressão detectada em macrófagos não estimulados. Entretanto, o acréscimo de CpG-ODN ao antígeno PFC induziu aumento significativo na porcentagem de células expressando CD86 (Figura 16B). A estimulação de células dendríticas com 2,5 µg/mL de PFC levou à modulação positiva significativa na expressão de CD86 em relação à porcentagem de células não estimuladas (Figura 16B). Células dendríticas estimuladas com 10 µg/mL de PFC ou com PFC acrescido de CpG-ODN também modularam positivamente a expressão deste receptor, embora não detectamos diferença significativa. Quando analisamos a MIF, observamos que nenhum dos estímulos utilizados modulou significativamente a expressão de CD86 tanto em macrófagos, quanto em células dendríticas (dados não mostrados).

A expressão de HLA-DR tanto em macrófagos quanto em células dendríticas não apresentou alteração após estimulação com PFC nas diferentes concentrações, com PFC acrescido de CpG-ODN ou com LPS (Figura 16C).

A expressão de CD83 em células dendríticas estimuladas com diferentes concentrações de PFC, PFC acrescido de CpG-ODN ou LPS foi modulada positivamente em relação às células não estimuladas. No entanto, não detectamos diferenças significativas (Figura 16D). Com relação à MIF não houve alteração na expressão de CD83 após estimulação de células dendríticas tanto com PFC quanto com LPS (dados não mostrados).



**Figura 16:** Expressão de marcadores de superfície associados com ativação celular em macrófagos e células dendríticas estimulados com DNA-hsp65. Macrófagos e células dendríticas foram estimulados ou não durante 48 horas com PFC a 2,5 ou 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ou com PFC (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) acrescido de motivos CpG (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Como controle positivo, as células foram estimuladas com LPS (500  $\text{ng}/\text{mL}$ ). As células foram avaliadas por citometria de fluxo quanto à expressão das moléculas CD80, CD86, HLA-DR e CD83. Resultados expressos como a média  $\pm$  SEM da porcentagem de células expressando CD80, CD86 e CD83, ou da MIF de HLA-DR obtidos de 1-4 culturas de macrófagos e 6-8 culturas de células dendríticas de indivíduos saudáveis. \*  $p < 0.05$ , em relação a macrófagos não estimulados; #  $p < 0.05$ , em relação a células dendríticas não estimuladas.

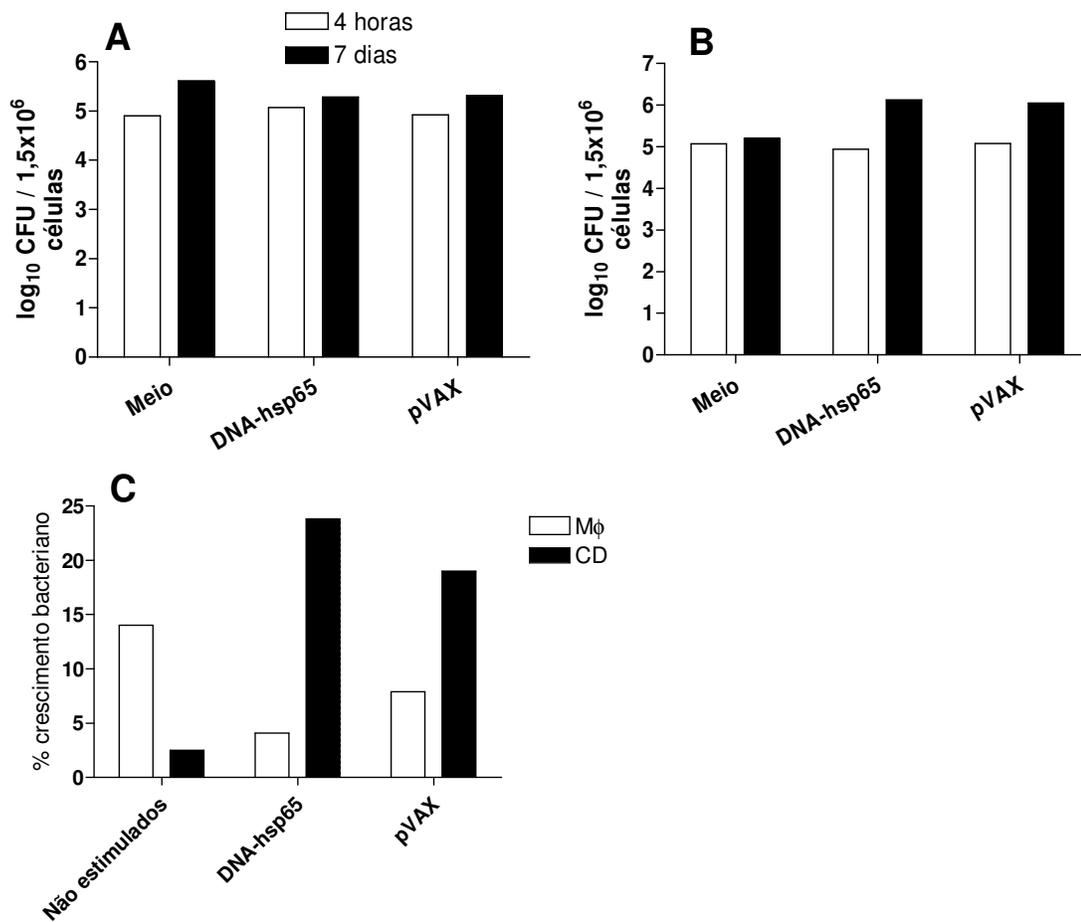
#### **14. Avaliação da capacidade microbicida de macrófagos e de células dendríticas estimulados ou não com DNA-hsp65**

Inicialmente realizamos a padronização dos experimentos de infecção *in vitro* de macrófagos e de células dendríticas com *M. tuberculosis*. A padronização consistiu em uma cinética para determinar a razão entre o número de bacilos e o número de células em cultura. Testamos três razões diferentes de bactéria por célula: 1:1, 5:1 e 10:1 (bactéria:célula). Os melhores resultados foram obtidos com a proporção 1 bactéria:1 célula. Para dar continuidade ao nosso estudo, macrófagos e células dendríticas foram estimulados ou não por 48 horas com a vacina DNA-hsp65 e infectados com *M. tuberculosis in vitro* (1:1). Quatro horas após a infecção, tempo suficiente para que os bacilos fossem fagocitados, as culturas de macrófagos ou de células dendríticas foram lisadas para avaliarmos os números de unidades formadoras de colônia (UFC). Desse modo, teríamos os números de UFC referentes à quantidade inicial de bacilos que foram fagocitados pelas células, ou seja, que estavam presentes dentro das células. Para determinarmos a capacidade destas APCs em conter ou não o crescimento dos bacilos, o número de UFC foi novamente avaliado 7 dias após a infecção.

Observamos que macrófagos previamente estimulados com a vacina DNA-hsp65 apresentaram um aumento de 0,21  $\log_{10}$  no número de UFC no final da infecção, enquanto macrófagos não estimulados apresentaram um aumento de 0,71  $\log_{10}$ . Macrófagos previamente estimulados com o vetor pVAX mostraram aumento de 0,39  $\log_{10}$  no número de UFC ao final da infecção (Figura 17A).

Células dendríticas previamente estimuladas com a vacina DNA-hsp65 e infectadas apresentaram um aumento de 1,18  $\log_{10}$  no número de UFC ao final da infecção enquanto as células dendríticas que não foram estimuladas previamente com a vacina de DNA mostraram um aumento de apenas 0,13  $\log_{10}$  no número de UFC. Células dendríticas previamente estimuladas com o vetor pVAX apresentaram aumento de 0,97  $\log_{10}$  no número de UFC (Figura 17B).

A Figura 17C mostra a taxa de crescimento de *M. tuberculosis* no interior de macrófagos e de células dendríticas representada pela porcentagem de crescimento do bacilo entre o início da infecção (4 horas) e o final (7 dias).



**Figura 17:** Capacidade de macrófagos ou células dendríticas estimulados ou não com DNA-hsp65 em restringir o crescimento de *M. tuberculosis*. Macrófagos (A) e células dendríticas (B) previamente estimulados ou não com a vacina DNA-hsp65 foram infectados *in vitro* com *M. tuberculosis* na proporção 1 bacilo : 1 célula. O número de UFC foi determinado 4 horas e 7 dias após a infecção. Porcentagem de crescimento de *M. tuberculosis* entre 4 horas e 7 dias de infecção (C). Resultado referente a um experimento representativo realizado uma vez para macrófagos e quatro vezes para células dendríticas.

## *Discussão*

---

## DISCUSSÃO

Nossa proposta inicial de trabalho consistiu em avaliar o potencial imunoestimulatório da vacina DNA-hsp65, que se mostrou protetora contra a TB experimental (Bonato et al., 1998; Lowrie et al., 1999; Silva et al., 1999; Bonato et al., 2004), sobre macrófagos e células dendríticas humanas. A justificativa relevante desse estudo baseou-se no fato de que as vacinas de DNA parecem conferir eficácia protetora nos modelos experimentais de infecção em roedores. No entanto, a eficácia das mesmas parece ser reduzida em animais de maior porte (Puaux & Michel, 2003). Além disso, julgamos essencial conhecer como ocorre a interação das APCs humanas, como os macrófagos e as células dendríticas, com a vacina DNA-hsp65, no sentido de que estas células da imunidade inata podem direcionar o padrão de ativação de linfócitos T (Pulendran et al., 1999; Rissoan et al., 1999).

Nesse contexto, inicialmente padronizamos os métodos de cultura para a obtenção de macrófagos e de células dendríticas a partir de monócitos humanos. Testamos várias metodologias descritas na literatura para o isolamento de monócitos do sangue periférico (Jones et al., 1989; Sallusto & Lanzavecchia, 1994), e verificamos que o uso do gradiente de Percoll para o isolamento de monócitos foi a que nos ofereceu os melhores resultados. Também testamos diferentes concentrações de GM-CSF e IL-4, citocinas utilizadas para a diferenciação de células dendríticas *in vitro* (Sallusto & Lanzavecchia, 1994) e de GM-CSF para a obtenção de macrófagos (Giacomini et al., 2001). Uma vez padronizada as condições de cultura, caracterizamos fenotipicamente os macrófagos e as células dendríticas diferenciados a partir dos monócitos. Observamos que os macrófagos apresentaram morfologia típica: células aderentes, espalhadas; além de expressarem constitutivamente níveis elevados de CD14, CD86 e HLA-DR. As células dendríticas se caracterizaram pela propriedade de serem não-aderentes, com a presença de dendritos, morfologia arredondada e tamanho inferior em relação aos macrófagos, além de expressarem constitutivamente níveis elevados de CD11c, CD86 e HLA-DR.

Uma etapa que antecedeu a avaliação do efeito imunoestimulatório da vacina DNA-hsp65 sobre as APCs humanas foi a determinação da capacidade destas células de capturarem a vacina em solução. Nossos resultados mostraram, pela primeira vez, que a vacina DNA-hsp65 em solução (“naked DNA”) foi capturada pelas APCs humanas, macrófagos e células dendríticas. Nós mostramos que, além

de terem capturado o plasmídeo contendo o gene da hsp65, estas APCs foram transfectadas pela vacina de DNA, uma vez que expressaram o RNAm para a proteína de choque térmico de 65 kDa (hsp65). Pela primeira vez também, evidenciamos que as células dendríticas derivadas de monócitos humanos, descritas como células dendríticas mielóides, assim como os macrófagos, expressaram o TLR9 intracelular, receptor que interage com CpG-ODN (Hemmi et al., 2000).

Recentemente, Basner-Tschakarjan et al. (2004) descreveram a macropinocitose como um dos principais mecanismos envolvidos na captura de um plasmídeo por queratinócitos humanos. Estes mesmos autores apontaram evidências de que duas proteínas de membrana são capazes de se ligar ao DNA e mediar sua internalização.

Ao ser internalizado por células da imunidade inata, o DNA bacteriano, descrito como sendo um padrão molecular associado a patógenos (PAMP), interage com receptores intracelulares, responsáveis pela transdução de sinais. Em 2001, foi descrito que o TLR9 interage com CpG-ODN (Hemmi et al., 2001), e é o principal receptor envolvido na transdução de sinais que resultarão na ativação celular. Latz et al. (2004) demonstraram que CpG-ODN localizam-se em endossomas primários logo após sua captura por células dendríticas plasmocitóides, enquanto o TLR9 localiza-se no retículo endoplasmático. Estes autores mostraram que a ligação do CpG-ODN ao TLR9 ocorre após a fusão dos endossomas primários contendo o CpG-ODN com projeções de membrana do retículo endoplasmático contendo TLR9. Os plasmídeos bacterianos, após serem capturados, desempenham suas propriedades imunoestimulatórias provavelmente também através da sinalização mediada por receptores intracelulares, como o TLR9. A expressão do RNAm para TLR9 é comumente descrita em células dendríticas plasmocitóides, enquanto em células dendríticas mielóides, a expressão do RNAm para o TLR9 não foi detectada (Kadowaki et al., 2001; Krug et al., 2001). Porém, Saikh et al. (2004) demonstraram que monócitos humanos expressaram baixos níveis de TLR9 na superfície celular, e após serem estimulados com CpG-ODN, apresentaram um aumento na expressão deste receptor na superfície. Complementando estes dados da literatura, nossos resultados mostraram que macrófagos e células dendríticas derivadas de monócitos do sangue periférico, descritas como células dendríticas mielóides, também expressaram o TLR9 intracelularmente. Vale a pena ressaltar que detectamos a

expressão da proteína, e não do RNAm como realizado por trabalhos anteriores (Kadowaki et al., 2001; Krug et al., 2001).

Alguns trabalhos sugeriram que a sinalização via TLR9 tem participação secundária na indução de respostas imunes pelas vacinas de DNA. Camundongos com deficiência na expressão de TLR9 foram capazes de montar uma resposta citotóxica específica após serem imunizados com plasmídeo de DNA (Spies et al., 2003). Tudor et al. (2005) demonstraram que camundongos deficientes de TLR9 foram capazes de montar uma resposta de anticorpos antígeno-específica, de padrão Th1, após imunização com plasmídeo de DNA codificando uma glicoproteína do *Herpes simplex*. No entanto, esta resposta foi menos intensa, quando comparada aos animais normais. Além disso, estes autores ainda mostraram que células dendríticas diferenciadas a partir de células da medula óssea de animais deficientes de TLR9 não foram capazes de sintetizar IL-12 e interferons do tipo I. Estes dados sugerem que a sinalização via TLR9 parece não ser necessária para a ativação de respostas mediadas por células T e B a antígenos codificados por uma vacina de DNA, mas como interfere na ativação da imunidade inata, pode resultar em resposta específica menos intensa. Dessa forma, a sinalização via TLR9 participaria na potencialização dos efeitos adjuvantes das vacinas de DNA.

Em 1984, Tokunaga et al. descreveram as propriedades imunoestimulatórias do DNA bacteriano. Eles observaram que extratos micobacterianos, ao serem injetados no interior de um carcinoma murino, promoviam a regressão tumoral. Esta propriedade foi associada à presença de ácidos nucléicos bacterianos. O DNA de bactérias contém relativamente alta frequência de seqüências de citosina e guanina não metiladas, denominadas de motivos CpG ou CpG oligodeoxinucleotídeos (CpG-ODN) (Krieg et al., 1995). A capacidade imunoestimulatória do DNA de organismos procariotos vem sendo atribuída a estas seqüências. No DNA dos vertebrados, as seqüências CpG, além de estarem presentes em menor número em relação ao DNA dos procariotos, estão metiladas, e portanto, suprimidas (Gurunathan et al., 2000).

Ao serem ativados pelos CpG-ODN, os linfócitos B proliferam ou secretam anticorpos e citocinas como a IL-6 (Krieg et al., 1995). CpG-ODN também estimulam células APCs profissionais, como macrófagos e células dendríticas, a secretarem citocinas como IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$  ou a sintetizarem o RNAm para as mesmas (Klinman et al., 1996; Stacey et al., 1996) e a modularem positivamente a expressão de moléculas coestimulatórias e de adesão (Hartmann et al. 1999). A presença de

CpG-ODN na estrutura do plasmídeo das vacinas de DNA explica em parte o motivo destas vacinas estimularem tão eficientemente a resposta imune. Além de carregarem um gene que codifica um antígeno de interesse, as vacinas de DNA possuem um adjuvante natural, representado pelo CpG-ODN. Como estas seqüências são eficientes na indução da síntese de IL-12 por APCs, acabam por estimular uma resposta celular de padrão Th1, importante na geração de uma imunidade protetora contra patógenos intracelulares.

Distintas seqüências CpG-ODN sintéticas foram descritas (Klinman et al., 2004). Estas seqüências podem estimular diferentes populações de células do sistema imune. O CpG-ODN descrito como tipo “B” é capaz de ativar a proliferação e secreção de citocinas por linfócitos B e por células dendríticas plasmocitóides (Hartmann et al., 2000; Verthelyi et al., 2001). O CpG-ODN tipo “A” ativa a maturação de APCs e induz a secreção de IFN- $\alpha$  por células dendríticas plasmocitóides (Hartmann et al., 2000; Verthelyi et al., 2001). O CpG-ODN tipo “C” estimula a secreção de IL-6 por linfócitos T e de IFN- $\alpha$  por células dendríticas plasmocitóides (Hartmann et al., 2003; Marshall et al., 2003). Além disso, existem algumas seqüências capazes de ativar especificamente células de camundongo, enquanto outras são específicas para células humanas.

Apesar de ser comumente aceito que as propriedades adjuvantes fornecidas pelos plasmídeos bacterianos são equivalentes àquelas fornecidas pelos CpG-ODN, alguns trabalhos mostraram evidências de que estas propriedades são distintas. Zelenay et al. (2003) estudaram comparativamente a capacidade de CpG-ODN e de plasmídeo bacteriano em ativar células do baço de camundongos. Eles observaram que o plasmídeo induziu a síntese moderada de IL-6 e altos níveis de IFN- $\gamma$ , enquanto a estimulação com seqüências CpG estimulou um perfil oposto de produção de citocinas, com a síntese de elevados níveis de IL-6 e níveis moderados de IFN- $\gamma$ .

Diante de todas as evidências descritas na literatura com relação ao potencial imunestimulador do DNA bacteriano, passamos a avaliar o efeito da estimulação de macrófagos e células dendríticas humanas com a vacina DNA-hsp65. Esta abordagem de estudo pode ser interpretada de duas maneiras distintas: 1) efeito inespecífico do plasmídeo bacteriano, centrado na propriedade adjuvante das seqüências CpG-ODN ou do próprio plasmídeo; 2) efeito específico, decorrente da

presença do gene que codifica o antígeno de interesse, resultando ou não em ativação da resposta imune adaptativa. Durante o desenvolvimento do nosso trabalho, avaliamos o efeito imunoestimulador inespecífico da vacina DNA-hsp65, apesar de termos detectado a mensagem para o gene hsp65 após a estimulação das APCs com a vacina de DNA. É importante ressaltar que avaliamos diferentes concentrações da vacina DNA-hsp65 a serem usadas na estimulação das culturas de macrófagos e células dendríticas e também asseguramos que o estímulo não estava levando à indução de morte celular por ativação.

Notamos que a estimulação das células com o plasmídeo DNA-hsp65 ou com o vetor pVAX induziu baixos níveis de apoptose, semelhantes aos níveis detectados em células que não haviam sido estimuladas. Estes níveis eram esperados, uma vez que as células foram cultivadas por longo período. Portanto, macrófagos e células dendríticas poderiam estar entrando em apoptose devido às condições e ao tempo de cultura, e não em decorrência do estímulo com a vacina de DNA.

Nossos resultados mostraram que macrófagos e células dendríticas são estimulados de maneira diferente, frente ao estímulo com a vacina DNA-hsp65. Enquanto macrófagos secretaram níveis significativos de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10, células dendríticas secretaram níveis elevados de IL-12p40. É interessante destacar que macrófagos não secretaram IL-12 (p40 ou p70) e os níveis das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e das quimiocinas MCP-1 e IP-10 secretados por células dendríticas estimuladas com o plasmídeo DNA-hsp65 foram inferiores quando comparados aos níveis secretados por macrófagos. Em vista disso, sugerimos que as células dendríticas, após serem estimuladas com a vacina DNA-hsp65, desempenham papel regulatório na ativação da resposta imune adaptativa. Células dendríticas ativadas pela vacina de DNA poderiam contribuir para a geração de uma resposta imune celular de padrão Th1 através da secreção de níveis mais elevados de IL-12 do que de IL-10. Por outro lado, macrófagos estimulados com a vacina DNA-hsp65 parecem desempenhar um papel mais efetor na resposta imune, através da secreção de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- $\alpha$ , que atuam no recrutamento de leucócitos para o local de infecção e também na capacidade microbicida destas células.

Para o estudo do fenótipo celular, padronizamos um método de aquisição dos macrófagos e das células dendríticas de forma a excluirmos as interferências dos linfócitos contaminantes presentes nas culturas. Para isso, a expressão das

moléculas de superfície foi avaliada com base no número de células adquiridas que, além de apresentarem tamanho e granularidade característicos de macrófagos e de células dendríticas, também expressavam os marcadores Mac-1 e CD11c, respectivamente. Assim, avaliamos a expressão das moléculas CD80, CD86, HLA-DR e CD83 em aproximadamente 3000 células que tinham tamanho e granularidade típicos de macrófagos e de células dendríticas, e que também eram positivos para os marcadores Mac-1 ou CD11c, respectivamente, excluindo os demais tipos celulares (linfócitos) contaminantes das amostras. Dessa forma, nos certificamos de que estávamos avaliando o fenótipo apenas nas populações celulares de interesse, além de garantirmos a aquisição de amostras com maior número de macrófagos e células dendríticas.

Observamos que células dendríticas apresentaram modulação positiva na expressão das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 após serem estimuladas com a vacina DNA-hsp65, enquanto em macrófagos o fenótipo celular não foi alterado.

Acreditamos que o fato de macrófagos e células dendríticas serem estimulados de maneira distinta pela vacina DNA-hsp65 pode estar relacionado com: 1) o balanço na densidade dos receptores que interagem com o plasmídeo expressos na superfície destas células; 2) o envolvimento de segundos mensageiros distintos relacionados com a transdução de sinais; 3) diferenças na capacidade de ambas as populações celulares em realizarem a macropinocitose do plasmídeo.

Notamos que este padrão diferencial de ativação de macrófagos e células dendríticas também foi observado após estimulação com os antígenos contidos nas proteínas de filtrado de cultura (PFC). Neste sentido, foi surpreendente o fato de que antígenos diferentes (proteínas secretadas ou antígeno liberado na forma de vacina de DNA) podem estimular, no mesmo tipo celular, padrões similares de produção de citocinas. No entanto, os sinais de perigo que promovem a ativação do sistema imune inato, sendo de natureza distinta, podem ser reconhecidos por diferentes receptores. Mesmo assim, este reconhecimento diferencial pode estar induzindo vias bioquímicas de ativação similares.

Ainda com relação à capacidade da vacina DNA-hsp65 em estimular diferentemente macrófagos e células dendríticas, um importante aspecto a ser considerado também é a natureza da célula estudada, assim como o seu estado inicial de ativação. Macrófagos da linhagem RAW267.7 estimulados com plasmídeo

bacteriano em solução produziram níveis de TNF- $\alpha$  significativamente maiores em relação a macrófagos peritoneais submetidos ao estímulo com o mesmo plasmídeo (Yasuda et al., 2004). Estes dados sugerem que o estado inicial de ativação da APC estimulada pelo plasmídeo desempenha uma função importante na ativação da resposta imune. A captura do plasmídeo por uma APC pode gerar uma resposta inflamatória, cuja potência dependerá do estado inicial de ativação dessa célula. Além disso, a expressão diferencial de receptores também pode influenciar na geração de uma resposta inflamatória. Em trabalho descrito recentemente, macrófagos alveolares murinos expressaram baixos níveis de RNAm para TLR9, enquanto macrófagos peritoneais ou derivados da medula óssea expressaram níveis elevados. Em resposta à estimulação com CpG-ODN, macrófagos peritoneais ou derivados da medula óssea secretaram níveis elevados de TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-6, e modularam positivamente a expressão de CD40, CD80 e CD86 (Suzuki et al., 2005). Dessa forma, os diferentes perfis de resposta de macrófagos e células dendríticas, após interagirem com a vacina DNA-hsp65, podem estar relacionados com a natureza das células, estado de diferenciação das mesmas, e com a densidade de receptores celulares que interagem com o plasmídeo.

Uma vez constatado que a vacina DNA-hsp65 foi capaz de ativar diferentemente macrófagos e células dendríticas, nós estudamos o efeito adicional destas APCs previamente estimuladas com o plasmídeo DNA-hsp65 em promoverem a ativação de células da resposta imune específica. Observamos que na reação mista de leucócitos, macrófagos e células dendríticas previamente estimulados com a vacina DNA-hsp65 induziram um aumento na proliferação de linfócitos TCD4<sup>+</sup> alogênicos. Como foi verificado que células dendríticas secretaram níveis significativos de IL-12 após estimulação com a vacina DNA-hsp65, cultivamos linfócitos T ativados com anticorpos anti-CD3, anti-CD28 e IL-2, juntamente com sobrenadantes de culturas de células dendríticas ou de macrófagos previamente estimulados ou não com o plasmídeo DNA-hsp65 e detectamos os níveis de IFN- $\gamma$  e IL-5. Observamos que os níveis de IL-12 secretados por células dendríticas estimuladas com o plasmídeo não foram suficientes para aumentar a secreção de IFN- $\gamma$  por linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>. Porém, os níveis de IL-12 secretados por células dendríticas estimuladas com LPS foram suficientes para estimular a secreção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos. Os sobrenadantes das culturas de macrófagos

estimulados com a vacina DNA-hsp65 foram capazes de estimular a secreção de IFN- $\gamma$  por linfócitos TCD4<sup>+</sup>. Uma vez que não observamos a síntese de IL-12 por macrófagos estimulados com DNA-hsp65, provavelmente, a estimulação adicional na secreção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos promovida pelos sobrenadantes das culturas de macrófagos seja devido a outros fatores solúveis presentes nos sobrenadantes. É interessante notarmos que os sobrenadantes de macrófagos estimulados com LPS, cujo nível de IL-10 foi elevado, inibiu a secreção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T. Estamos realizando novos experimentos utilizando uma dose maior da vacina de DNA na expectativa de verificarmos o efeito adicional da secreção de IL-12 por estas APCs profissionais sobre linfócitos T, além de aumentarmos o número de culturas analisadas.

Após verificarmos que macrófagos e células dendríticas foram capazes de capturar a vacina de DNA em solução, e que ambas as populações celulares expressavam o receptor que interage com motivos CpG, o TLR9, analisamos a capacidade destas células em transcrever o gene da hsp65, codificado pelo plasmídeo. Observamos que tanto macrófagos quanto células dendríticas expressaram o RNAm da hsp65 no citoplasma. Em estudos subseqüentes, avaliaremos a ativação da resposta imune específica por estas células. Pretendemos estudar a capacidade destas APCs previamente estimuladas com DNA-hsp65 em sintetizar a proteína hsp65 e também avaliar a capacidade de macrófagos e de células dendríticas de estimularem linfócitos T autólogos. Coelho-Castelo et al. (2003) demonstraram que células dendríticas CD11c<sup>+</sup>, obtidas de linfonodos de camundongos BALB/c que foram imunizados com plasmídeo DNA-hsp65, foram eficientemente transfectadas em comparação com células dendríticas CD11c<sup>+</sup> obtidas da medula óssea. Esse dado sugere células dendríticas maduras, presentes nos linfonodos, são mais competentes em capturar o plasmídeo de DNA que células imaturas, presentes na medula óssea. Baseando-se nisso, é nosso interesse avaliar se a estimulação com DNA-hsp65 induz eficiente maturação das células dendríticas humanas, sendo capaz de ativar os linfócitos T.

Durante o desenvolvimento desse projeto, pudemos definir como etapa inicial cumprida, os resultados que evidenciaram a obtenção de duas populações distintas de APCs a partir de monócitos humanos, a captura da vacina DNA-hsp65, a expressão de TLR9 intracelular e a mensagem para a proteína hsp65 em ambas as

populações celulares. Adicionalmente, mostramos que os macrófagos e as células dendríticas são ativadas distintamente pela vacina DNA-hsp65. A abordagem de estudo subsequente e essencial a ser avaliada seria a capacidade destas células estimuladas com DNA-hsp65 de restringirem ou não o crescimento dos bacilos após infecção com *M. tuberculosis in vitro*.

Nossos resultados mostraram que macrófagos previamente estimulados com a vacina DNA-hsp65, apesar de não terem sido capazes de inibir totalmente o crescimento do bacilo, foram mais eficientes em conter o crescimento de *M. tuberculosis*, em relação aos macrófagos que não foram previamente estimulados. Por outro lado, células dendríticas estimuladas com DNA-hsp65 não foram eficientes em conter o crescimento dos bacilos, quando comparadas às células que não foram estimuladas. Bodnar et al. (2001) descreveram que *M. tuberculosis* multiplicava-se de modo similar dentro de macrófagos e células dendríticas imaturas derivadas da medula óssea *in vitro*. A ativação destas células com LPS e IFN- $\gamma$  inibia o crescimento dos bacilos por uma via dependente de óxido nítrico. No entanto, somente os macrófagos ativados apresentaram a capacidade de matar *M. tuberculosis*, sugerindo que as células dendríticas poderiam servir como um reservatório para bacilos nos tecidos com a finalidade de ativar os linfócitos. Nesse contexto, nosso resultado sugere que a estimulação de macrófagos com a vacina DNA-hsp65 ativa mecanismos microbicidas capazes de conter o crescimento dos bacilos, enquanto células dendríticas estimuladas com a vacina DNA-hsp65 teriam a função de atuar principalmente no processamento e apresentação de antígenos para linfócitos T.

Os resultados descritos até este momento sugerem que o efeito estimulatório da vacina DNA-hsp65 sobre macrófagos e células dendríticas humanas está associado à ativação promovida pela estrutura do plasmídeo bacteriano, e não está relacionado ao gene hsp65 ou seu produto, uma vez que o vetor pVAX também foi capaz de estimular os macrófagos e as células dendríticas eficientemente.

O desenvolvimento de novas medidas profiláticas é direcionado por vários requisitos a serem cumpridos em cada etapa do processo de obtenção de novas vacinas. Um dos primeiros requisitos a ser ultrapassado é a escolha de um antígeno (s), que além de ser um bom imunógeno, seja caracterizado como um antígeno imunodominante capaz de ativar uma resposta imune associada com proteção. A hsp65 é considerada um antígeno imunodominante nas infecções micobacterianas

pelo fato de cerca de 10-20% dos linfócitos T serem específicos para este antígeno em modelos experimentais (Kaufmann et al., 1987). Como já foi descrito, a vacina DNA-hsp65 apresentou efeito profilático (Bonato et al., 1998; Silva et al., 1999) e terapêutico (Lowrie et al., 1999 e Bonato et al., 2004) no modelo de tuberculose experimental que utiliza linhagem de camundongos isogênicos. Nossa preocupação, atualmente, concentra-se na fase de ensaios clínicos, no fato da população ser heterogênea com relação à poligenia e ao polimorfismo das moléculas do MHC e conseqüentemente, montar uma resposta distinta contra o antígeno hsp65. Além disso, as proteínas de choque térmico (hsps) são filogeneticamente muito conservadas, o que nos chama a atenção para o risco de desenvolvimento de doenças autoimunes. Assim, mesmo com uma vacina eficiente em modelo experimental, temos trabalhado com outros antígenos de potencial vacinal como as proteínas secretadas por *M. tuberculosis* em meio de cultura, denominadas de PFC (proteínas do filtrado de cultura). As PFC também são consideradas antígenos imunodominantes nas infecções micobacterianas (Pal & Horwitz, 1992). Diversas proteínas constituintes da preparação PFC têm sido caracterizadas e estão associadas com o desenvolvimento de uma resposta imune protetora (Andersen, 1994; Roche et al., 1994). Quando separadas por eletroforese de acordo com o peso molecular, determinadas frações destas proteínas estimulam a secreção de IFN- $\gamma$  por linfócitos TCD4<sup>+</sup> murinos *in vitro* (Roberts et al., 1995). Portanto, paralelamente ao estudo do potencial imunoestimulador da vacina DNA-hsp65, também avaliamos a capacidade das PFC, acrescidas ou não de CpG-ODN, de ativarem macrófagos e células dendríticas humanas.

Nossos resultados demonstraram padrão similar de ativação após estimulação das culturas de macrófagos e de células dendríticas humanas com PFC quando comparado à estimulação com DNA-hsp65. Enquanto macrófagos secretaram níveis elevados de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10, células dendríticas secretaram níveis elevados de IL-12 e da quimiocina IP-10. É interessante destacar que macrófagos não secretaram IL-12 e os níveis das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 secretados por células dendríticas estimuladas com PFC também foram inferiores quando comparados aos níveis secretados por macrófagos. Com relação à produção de quimiocinas, macrófagos e células dendríticas secretaram níveis significativos de

IP-10 após estimulação com o antígeno PFC, o que não foi observado após estimulação com DNA-hsp65.

As diferenças no padrão de ativação de macrófagos e células dendríticas após contato com o antígeno podem refletir no tipo e na intensidade da resposta imune inflamatória induzida pelas APCs. Se houver maior número de macrófagos interagindo com o antígeno (DNA ou PFC) no microambiente, a tendência será a indução de uma resposta inflamatória devido à produção das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6. Em contrapartida, se houver uma maior interação do antígeno com células dendríticas, haverá secreção de IL-12 no microambiente. No entanto, ambos os tipos de APCs produziram níveis significativos de IP-10 após contato com PFC. A IP-10, uma quimiocina cuja produção é induzida por IFN- $\gamma$ , participa no recrutamento de linfócitos Th1 ativados para os locais da inflamação. Neste sentido, a presença deste fator quimiotático pode influenciar no desenvolvimento de uma resposta de padrão Th1, importante na proteção contra infecções micobacterianas.

Nos últimos anos, a interação de vários receptores de reconhecimento padrão (PRR), expressos na superfície de macrófagos e de células dendríticas, com PAMPs vem sendo descrita (Schlesinger et al., 1993; Means et al., 1999; Pugin et al., 1994; Geitenbeek et al., 2003). Acredita-se que dependendo do tipo de receptor, expresso na superfície das APCs que interage com determinado ligante, expresso na parede dos bacilos, haja uma ativação celular diferencial (Kaufmann & Schaible, 2003). Os trabalhos que melhor descreveram este tipo de interação, até o presente momento, sugerem que a ligação de LAM ao TLR2, expresso em macrófagos e células dendríticas humanas, induziria a produção de IL-12 (Heldwein & Fenton, 2002), enquanto a ligação de LAM com ao receptor DC-SIGN estimularia a produção de IL-10 (Tailleux et al., 2002; Geijtenbeek et al., 2003). Partindo destas informações, a próxima etapa de nosso trabalho consistirá em avaliar a função dos receptores TLR2, TLR4 e MR na infecção *in vitro* com *M. tuberculosis*.

Apesar dos estudos *in vitro* não mimetizarem exatamente os mecanismos de ativação celular que acontecem *in vivo*, nosso estudo fornece uma hipótese de como as APCs, macrófagos e células dendríticas humanas, poderiam estar sendo ativadas após a administração da vacina DNA-hsp65. Além disso, nossos resultados mostraram, pela primeira vez, que a vacina de DNA que apresentou atividade profilática e terapêutica contra a TB, foi capaz de ativar APCs humanas. Estes resultados auxiliam no melhor entendimento da interação parasita-hospedeiro e

contribuem para a continuidade do processo de desenvolvimento de uma nova vacina contra TB, inclusive fornecendo subsídios para a realização dos ensaios clínicos. Além disso, as evidências experimentais decorrentes do estudo da interação de células dendríticas com DNA abrem perspectivas para a descoberta de novas estratégias de terapia imune, baseadas na regulação da resposta imune.

## *Conclusões*

---

## CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que:

- 1) A vacina DNA-hsp65 em solução foi capturada eficientemente por macrófagos e células dendríticas humanas;
- 2) Macrófagos e células dendríticas humanas foram transfectadas pela vacina DNA-hsp65 e expressaram o RNAm para hsp65;
- 3) Macrófagos e células dendríticas humanas expressaram TLR9 intracelular, que pode ser o receptor responsável pela transdução de sinais nestas células estimuladas com DNA-hsp65, resultando na ativação das mesmas;
- 4) Macrófagos e células dendríticas humanas, após serem estimulados com DNA-hsp65, foram ativadas de maneira distinta. Esta ativação diferencial foi caracterizada pela síntese de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 por macrófagos e de IL-12 por células dendríticas. Macrófagos não secretaram IL-12 e células dendríticas secretaram baixos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 frente a estimulação com DNA-hsp65. Além disso, DNA-hsp65 regulou positivamente a expressão de CD80 e CD86 em células dendríticas;
- 5) Macrófagos estimulados com DNA-hsp65 e posteriormente infectados com *M. tuberculosis* foram capazes de restringir o crescimento dos bacilos, enquanto células dendríticas foram incapazes;
- 6) A estimulação com PFC resultou num padrão de ativação de macrófagos e células dendríticas semelhante ao padrão induzido pela vacina DNA-hsp65 (item 7 de Resultados), com exceção à produção da quimiocina IP-10 por macrófagos e células dendríticas, e à expressão de CD86 por macrófagos, que foi induzida após estimulação com PFC, e não com DNA-hsp65.

## *Bibliografia*

---

## BIBLIOGRAFIA

ADAMS, D.O., HAMILTON, T.A. Molecular basis of macrophage activation: diversity and its origins. In: LEWIS & MCGEE (Eds.) **The macrophage**. Oxford University Press, p. 75-114, 1992.

ANDERSEN, P. Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 2536-44, 1994.

ARMSTRONG, J.A. & HART, P.D.A. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. **J. Exp. Med.**, v. 142, p. 1-16, 1975.

BALLAS, Z.K., RASMUSSEN, W.L., KRIEG, A.M. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. **J. Immunol.**, v. 157, p. 1840-7, 1996.

BANCHEREAU, J., STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v.392: p.245-52, 1998.

BARNES, P.F. et al. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. **N. Engl. J. Med.**, v. 324, p. 1644-50, 1991.

BAROUCH, D.H. 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.

BASNER-TSCHAKARJAN, E. et al. Uptake and trafficking of DNA in keratinocytes: evidence for DNA-binding proteins. **Gene Ther.**, v. 11, p. 765-74, 2004.

BEAN, A.G. et al. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. **J. Immunol.**, v. 162, p. 3504-11, 1999.

- 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.
- BERMUDEZ, L.E., CHAMPSI, J. Infection with *Mycobacterium avium* induces production of interleukin-10 (IL-10), and administration of anti-IL-10 antibody is associated with enhanced resistance to infection in mice. **Infect. Immun.**, v. 1, p. 3093-7, 1993.
- BLOOM, B.R., JACOBS, W.R JR. New strategies for leprosy and tuberculosis and for development of bacillus Calmette-Guerin into a multivaccine vehicle. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.569, p.155-73, 1989.
- BODNAR, K.A., SERBINA, N.V., FLYNN, J.L. Fate of *Mycobacterium tuberculosis* within murine dendritic cells. **Infect. Immun.**, v.69, p. 800-9, 2001.
- BONATO, V.L. 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.
- BONATO, V.L. et al. Immune regulatory effect of pHSP65 DNA therapy in pulmonary tuberculosis: activation of CD8+ cells, interferon-gamma recovery and reduction of lung injury. **Immunology**, v. 113, p. 130-8, 2004.
- BOOM, W.H. et al. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. **Tuberculosis**, v. 83, p. 98-106, 2003.
- 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. 672-8, 2002.
- CANADAY, D.H. et al. Activation of human CD8+ alpha beta TCR+ cells by *Mycobacterium tuberculosis* via an alternate class I MHC antigen-processing pathway. **J. Immunol.**, v. 162, p. 372-9, 1999.

CARUSO, A.M. et al. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. **J. Immunol.**, v. 162, p. 5407-16, 1999.

CHACKERIAN, A.A., THUSHARA, V.P., BEHAR, S.M. Gamma interferon-producing CD4+ T lymphocytes in the lung correlate with resistance to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, v.69, p. 2666-74, 2001.

CHATTERGOON, M.A. et al. Specific immune induction following DNA-based immunization through in vivo transfection and activation of macrophages/antigen-presenting cells. **J. Immunol.**, v. 160, p. 5707-18, 1998.

COELHO-CASTELO, A.A. et al. B-lymphocytes in bone marrow or lymph nodes can take up plasmid DNA after intramuscular delivery. **Hum. Gene Ther.**, v. 14, p. 1279-85, 2003.

COLDITZ, G.A. et al. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. **J. Am. Med. Assoc.**, v.271: p.698-702, 1994.

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, p. 537-44, 1998.

COOPER, A.M. et al. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. **J. Exp. Med.**, v. 178, p. 2243-7, 1993.

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, 1997. a

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. b

COOPER, A.M. et al. Transient loss of resistance to pulmonary tuberculosis in p47(phox<sup>-/-</sup>) mice. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 1231-4, 2000.

CORR, M. et al. Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. **J. Exp. Med.**, v. 184, p. 1555-60, 1996.

DANNENBERG, A.M. Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. **Rev. Infect. Dis.**, v.11, p. S369-78, 1989.

DEMANGEL, C. et al. Protection against aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection using *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin-infected dendritic cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, p. 1972-9, 1999.

DOWNING, J.F. et al. Surfactant protein A promotes attachment of *Mycobacterium tuberculosis* to alveolar macrophages during infection with human immunodeficiency virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p. 4848-52, 1995.

EAST, L., ISACKE, C.M. The mannose receptor family. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1572, p. 364-86, 2002.

EHLERS, S. Immunity to tuberculosis: a delicate balance between protection and pathology. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 23, p. 149-58, 1999.

EHRT, S. et al. Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and *Mycobacterium tuberculosis*: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. **J. Exp. Med.**, v. 194, p. 1123-40, 2001.

EPSTEIN, J.E. et al. Safety, tolerability, and antibody responses in humans after sequential immunization with a PfCSP DNA vaccine followed by the recombinant protein vaccine RTS,S/AS02A. **Vaccine**, v. 22, p. 1592-603, 2004.

FINE, P.E. The BCG story: lessons from the past and implications for the future. **Rev. Infect. Dis.**, v. 2, p. S353-9, 1989.

FINE, PE. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. **Lancet.**, v. 346, p. 1339-45, 1995.

FLYNN, J.L. et al. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.89. p. 12013-17, 1992.

FLYNN, J.L. et al. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J. Exp. Med.**, v. 178, p. 2249-54, 1993.

GEIJTENBEEK, T.B. et al. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. **J. Exp. Med.**, v. 197, p. 7-17, 2003.

GIACOMINI, E. et al. Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. **J. Immunol.**, vol.166: 7033-41, 2001.

GONZALEZ-JUARRERO, M., ORME, I. M. Characterization of murine lung dendritic cells infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immunol.**, v.69: p.1127-33, 2001.

GUERMONPREZ, P. et al. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 621-67, 2002.

GURUNATHAN, S., KLINMAN, D. M., SEDER, R. A. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. **Ann. Rev. Immunol.**, v.18, p. 927-74, 2000.

HARTMANN, G., WEINER, G.J., KRIEG, A.M. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 96, p. 9305-10, 1999.

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.

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

HELDWEIN, K.A., FENTON, M.J. The role of Toll-like receptors in immunity against mycobacterial infection. **Microbes Infect.**, v. 4, p. 937-44, 2002.

HEMMI, H. et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature**, v. 408, p. 740-5, 2000. Erratum in: **Nature**, v. 409, p. 646, 2001.

HENDERSON, R.A., WATKINS, S.C., FLYNN, J.L. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Immunol.**, v. 159, p. 635-43, 1997.

HERRMANN, J. & LAGRANGE, P. Dendritic cells and *Mycobacterium tuberculosis*: which is the Trojan horse? **Pathol. Biol.**, v. 53, p. 35-40, 2005.

HIRSCH, C.S. et al. Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor alpha-mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages. **J. Immunol.**, v. 152, p. 743-53, 1994.

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

HOAL-VAN HELDEN, E.G. et al. Diversity of in vitro cytokine responses by human macrophages to infection by *Mycobacterium tuberculosis* strains. **Cell. Biol. Int.**, v. 25, p. 83-90, 2001.

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

HORWITZ, M.A. et al. Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 1530-4, 1995.

IWASAKI, A. et al. The dominant role of bone marrow-derived cells in CTL induction following plasmid DNA immunization at different sites. **J. Immunol.**, v. 159, p. 11-4, 1997.

IYODA, T. et al. The CD8<sup>+</sup> dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and *in vivo*. **J. Exp. Med.**, v. 195, p. 1289-302, 2002.

JIAO, X. et al. Dendritic cells are host cells for mycobacteria *in vivo* that trigger innate and acquired immunity. **J. Immunol.**, v. 168, p. 1294-301, 2002.

JONES, B.M. et al. Comparison of monocyte separation methods using flow cytometric analysis. **J. Immunol. Methods.**, v. 125, p. 41-7, 1989.

KADOWAKI, N., et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. **J. Exp. Med.**, v. 194, p. 863-9, 2001.

KALINSKI, P. et al. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. **Immunol. Today**, v.20: p.561-67, 1999.

KAMATH, A.B. et al. Toll-like receptor 4-defective C3H/HeJ mice are not more susceptible than other C3H substrains to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 4112-8, 2003.

KAPSENBERG, M.L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, p. 984-93, 2003.

KAUFMANN, S.H. et al. Enumeration of T cells reactive with *Mycobacterium tuberculosis* organisms and specific for the recombinant mycobacterial 64-kDa protein. **Eur. J. Immunol.**, v. 17, p. 351-7, 1987.

KAUFMANN, S.H.E. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells and macrophages. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 61, p. ii54-8, 2002.

KAUFMANN, S.H., 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, p. 1-5, 2003.

KITA, Y. et al. Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. **Vaccine**, v. 23, p. 2132-5, 2005.

KLINMAN, D.M. et al. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 2879-83, 1996.

KLINMAN, D.M. et al. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. **Immunol. Rev.**, v. 199, p. 201-16, 2004.

KRIEG, A.M. et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. **Nature**, v. 374, p. 546-9, 1995.

KRUG, A. et al. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, p. 3026-37, 2001.

LAGRANDERIE, M.R. et al. Comparison of immune responses of mice immunized with five different *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 1-9, 1996.

LARSSON, M., FONTENEAU, J. F., BHARDWAJ, N. Dendritic cells resurrect antigens from dead cells. **Trends Immunol.**, v.22: p.141-48, 2001.

LATZ, E. et al. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. **Nat. Immunol.**, v. 5, p. 190-8, 2004.

LEEMANS, J.C. et al. CD44 is a macrophage binding site for *Mycobacterium tuberculosis* that mediates macrophage recruitment and protective immunity against tuberculosis. **J. Clin. Invest.**, v. 111, p. 681-9, 2003.

- LEVETON, C. et al. T-cell-mediated protection of mice against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 390-5, 1989.
- LIMA, K.M. et al. Efficacy of DNA-hsp65 vaccination for tuberculosis varies with method of DNA introduction in vivo. **Vaccine**, v. 22, p. 49-56, 2003. a
- LIMA, K.M. et al. Single dose of a vaccine based on DNA encoding mycobacterial hsp65 protein plus TDM-loaded PLGA microspheres protects mice against a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. **Gene Ther.**, v. 10, p. 678-85, 2003. b
- LINEHAN, S.A., MARTINEZ-POMARES, L., GORDON, S. Macrophage lectins in host defence. **Microbes. Infect.**, v. 2, p. 279-88, 2000.
- LOWRIE, D.B. et al. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. **Nature**, v.400, p. 269-71, 1999.
- MACGREGOR, R.R. et al. T-cell responses induced in normal volunteers immunized with a DNA-based vaccine containing HIV-1 env and rev. **AIDS**, v. 16, p. 2137-43, 2002.
- MALIK, Z.A., DENNING, G.M., KUSNER, D.J. Inhibition of Ca<sup>2+</sup> signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages. **J. Exp. Med.**, v.191, p. 287-302, 2000.
- MALIK, Z.A., IYER, S.S., KUSNER, D.J. *Mycobacterium tuberculosis* phagosomes exhibit altered calmodulin-dependent signal transduction: contribution to inhibition of phagosome-lysosome fusion and intracellular survival in human macrophages. **J. Immunol.**, v. 166, p. 3392-401, 2001.
- 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. **Leukoc. Biol.**, v. 73, p. 781-92, 2003.

MEANS, T.K., GOLENBOCK, D.T., FENTON, M.J. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Immunol.**, v.163, p. 3920-7, 1999.

MOREIRA, A.L. et al. Aerosol infection of mice with recombinant BCG secreting murine IFN-gamma partially reconstitutes local protective immunity. **Microb. Pathog.**, v. 29, p. 175-85, 2000.

MOSMANN, T.R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, v. 136, p. 2348-57, 1986.

NOLTE, F.S., METCHOCK, B. *Mycobacterium*. In: MURRAY, P.R., BARON, E.J., PFALLER, M.A., TENOVER, F.C., YOLKEN, F.H. (ed.) **Manual of clinical microbiology**, 6th ed. Washington, American Society of Microbiology, 1995. p. 400.

NOMURA, F. et al. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. **J. Immunol.**, v. 164, p. 3476-9, 2000.

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 tool. **Trends Biotechnol.**, v. 15, p. 512-7, 1997.

ORME, I.M., COLLINS, F.M. Protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection by adoptive immunotherapy. Requirement for T cell-deficient recipients. **J. Exp. Med.**, v. 158, p. 74-83, 1983.

- ORME, I.M. The role of CD8+ T cells in immunity to tuberculosis infection. **Trends. Microbiol.**, v. 1, p. 77-8, 1993.
- OTTENHOFF, T.H., KUMARARATNE, D., CASANOVA, J.L. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-I cytokines in immunity to intracellular bacteria. **Immunol. Today**, v. 19, p. 491-4.
- PAL, P.G., HORWITZ, M.A. Immunization with extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis* induces cell-mediated immune responses and substantial protective immunity in a guinea pig model of pulmonary tuberculosis. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 4781-92, 1992.
- PORGADOR, A. et al. Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. **J. Exp. Med.**, v. 188, p. 1075-82, 1998.
- PRIGOZY, T.I. et al. The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules. **Immunity**, v. 6, p. 187-97, 1997.
- PUAUX, A.L., MICHEL, M.L. New gene-based approaches for an AIDS vaccine. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 26, p. 357-72, 2003.
- PUGIN, J. et al. CD14 is a pattern recognition receptor. **Immunity**, v. 6, p. 509-16, 1994.
- PULENDRAN, B. et al. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.96: p.1036-41, 1999.
- RAGNO, S. et al. Changes in gene expression in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*: a combined transcriptomic and proteomic approach. **Immunology**, v. 104. p. 99-108, 2001.

REILING, N. et al. Cutting edge: Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Immunol.**, v. 169, p. 3480-4, 2002.

RILEY, 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.

RISSOAN, M.C. et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. **Science**, v.283: p.1183-86, 1999.

ROBERTS, A.D. et al. Characteristics of protective immunity engendered by vaccination of mice with purified culture filtrate protein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. **Immunology**, v.85, p.502-07, 1995.

ROCHE, P.W. et al. Differential T cell responses to mycobacteria-secreted proteins distinguish vaccination with bacille Calmette-Guerin from infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Infect. Dis.**, v. 170, p. 1326-30, 1994.

RUBERTI, M. et al. Prime-boost vaccination based on DNA and protein-loaded microspheres for tuberculosis prevention. **J. Drug Targeting**, v. 12, p. 195-203, 2004.

RUSSELL, D.G., DANT, J., STURGILL-KOSZYCKI, S. *Mycobacterium avium*- and *Mycobacterium tuberculosis*-containing vacuoles are dynamic, fusion-competent vesicles that are accessible to glycosphingolipids from the host cell plasmalemma. **J. Immunol.**, v. 156, p. 4764-73, 1996.

SAIKH, K.U. et al. Human monocytes infected with *Yersinia pestis* express cell surface TLR9 and differentiate into dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 173, p. 7426-34, 2004.

SALLUSTO, F., LANZAVECCHIA, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. **J. Exp. Med.**, v. 179, p. 1109-18, 1994.

SCHLESINGER, L.S., HORWITZ, M.A. Phagocytosis of leprosy bacilli is mediated by complement receptors CR1 and CR3 on human monocytes and complement component C3 in serum. **J. Clin. Invest.**, v. 85, p. 1304-14, 1990.

SCHLESINGER, L.S. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. **J. Immunol.**, v. 150, p. 2920-30, 1993.

SCHLESINGER, L.S., HULL, S.R., KAUFMAN, T.M. Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages. **J. Immunol.**, v. 52, p. 4070-9, 1994.

SCHULLER-LEWIS, 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. 1-4, 1994.

SHORTMAN, K., LIU, Y-J. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nature Reviews**, v.21: p.151-61, 2002.

SILVA, C.L. et al. Characterization of the memory/activated T cells that mediate the long-lived host response against tuberculosis after bacillus Calmette-Guerin or DNA vaccination. **Immunology**, v. 97, p. 573-81, 1999.

SILVA, C.L. et al. Cytotoxic T cells and micobacteria. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 197, p. 11-8, 2001.

SMITH, D. W. Protective effect of BCG in experimental tuberculosis. **Adv. Tuberc. Res.**, v.22, p.1-97, 1985.

SOUSA, A.O. et al. Relative contributions of distinct MHC class I-dependent cell populations in protection to tuberculosis infection in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.97, p. 4204-08, 1999.

SPIES, B. et al. Vaccination with plasmid DNA activates dendritic cells via Toll-like receptor 9 (TLR9) but functions in TLR9-deficient mice. **J. Immunol.**, v. 171, p. 5908-12, 2003.

STACEY, K.J., SWEET, M.J., HUME, D.A. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. **J. Immunol.**, v. 157, p. 2116-22, 1996.

STENGER, S. et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. **Science**, v. 282, p. 121-5, 1998.

STENGER, S. Cytolytic T cells in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 33, p. 483-7, 2001.

SUZUKI, K. et al. Impaired Toll-like Receptor 9 Expression in Alveolar Macrophages with No Sensitivity to CpG DNA. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med.**, v. 171, p. 707-13, 2005.

TAILLEUX, L. et al. DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v. 197. p. 119-25, 2002.

TAKEDA, K., AKIRA S. TLR signaling pathways. **Semin. Immunol.**, v. 16, p. 3-9, 2004.

THE WORLD HEALTH REPORT 2004. Changing History. **WHO**, Geneva, Switzerland, 2004.

THOMA-USZYNSKI, S. et al. Activation of toll-like receptor 2 on human dendritic cells triggers induction of IL-12, but not IL-10. **J. Immunol.**, v. 165, p. 3804-10, 2000.

THURNHER, M. et al. Bacillus Calmette-Guerin mycobacteria stimulate human blood dendritic cells. **Int. J. Cancer.**, v.70, p. 128-34, 1997.

TOKUNAGA, T. et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 72, p. 955-62, 1984.

TSUJI, S. et al. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 6883-90, 2000.

TUDOR, D. et al. TLR9 pathway is involved in adjuvant effects of plasmid DNA-based vaccines. **Vaccine**, v. 23, p. 1258-64, 2005.

ULMER, J.B. et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. **Science**, v.259: p.1745-49, 1993.

VERTHELYI, D. et al. CpG oligodeoxynucleotides as vaccine adjuvantes in primates. **J. Immunol.**, v. 164, p. 944-52, 2002.

WOLFF, J.A. et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. **Science**, v.247, p. 1465-8, 1990.

YASUDA, K. et al. Restricted cytokine production from mouse peritoneal macrophages in culture in spite of extensive uptake of plasmid DNA. **Immunology**, v. 111, p. 282-90, 2004.

ZELENAY, S., ELIAS, F., FLO, J. Immunostimulatory effects of plasmid DNA and synthetic oligodeoxynucleotides. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, p. 1382-92, 2003.

# 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](#)