

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

Diferentes Estratégias Vacinais na Proteção Contra Tuberculose

Patrícia Rodrigues Marques de Souza

Ribeirão Preto
2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

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

Diferentes Estratégias Vacinais na Proteção Contra Tuberculose

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

Orientador: Prof. Dr Célio Lopes Silva

Ribeirão Preto
2006

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

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Souza, Patrícia Rodrigues Marques

Diferentes Estratégias Vacinais na Proteção Contra Tuberculose Ribeirão Preto, 2006.

n. páginas: 112 p.: il. ; 28cm

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Célio Lopes Silva.

1. Estratégias de vacinação; 2. Vacina DNA-Hsp65 3. Tuberculose

Vencerás

Não desanimes.

Persiste mais um tanto.

Não cultive pessimismo.

Esquece as sugestões do medo destrutivo.

Segue adiante, mesmo varando a sombra dos próprios erros.

Avança ainda que seja por entre lágrimas.

Trabalha constantemente.

Edifica sempre.

Não consintas que o gelo do desencanto te entorpeça o coração.

Não te impressione a dificuldade.

Convence-te de que a vitória espiritual é construção para dia-a-dia.

Não desista da paciência.

Não creias em realização sem esforço.

Silêncio para a injúria.

Olvido para o mal.

Perdão às ofensas.

Recorda que os agressores são doentes.

Não permitas que os irmãos desequilibrados te destruam o trabalho ou te apaguem a esperança.

Não menosprezes o dever que a consciência te impõe.

Se te enganaste em algum trecho do caminho, reajusta a própria visão e procura o rumo certo.

Não contes vantagens, nem fracassos.

Estuda buscando aprender.

Não te voltes contra ninguém.

Não dramatize provocações ou problemas.

Conserva o hábito da oração para que se te faça luz na vida íntima.

Resguarda-te em Deus persevera no trabalho que Deus te confiou.

Ama sempre, fazendo pelos outros o melhor que possas realizar.

Age auxiliando.

Serve sem apego

E assim vencerás.

Emmanuel (médiun: Francisco Cândido Xavier)

Dedicatória:

A meus amados pais Geraldo Ozanan Rodrigues e Cleuza Basílio Rodrigues que são tudo para mim, exemplo de dedicação e amor aos filhos.

A meu marido Leandro Marques de Souza pelo amor incondicional sempre. Com quem compartilho todos os meus sonhos e ideais.

A meus irmãos Rogério Rodrigues e Rodrigo Basílio Rodrigues pelo amor, apoio e amizade.

A meus queridos Jerônimo Quintino de Souza, Rosa Maria Marques de Souza e Alessandro Marques de Souza pelo amor e dedicação.

Agradecimentos:

Prof. Dr. Célio Lopes Silva meu orientador que me acolheu em seu laboratório e é um exemplo de visão empreendedora, coragem e otimismo frente aos problemas. Obrigada professor pela oportunidade e contribuição para meu crescimento científico.

As Professoras Dra. Arlete Aparecida Coelho Castelo e Dra. Vânia Luiza Deperon Bonato, pela co-orientação e amizade, durante todo o meu mestrado principalmente perante os problemas a serem solucionados, para mim exemplos de dedicação e competência.

As Professoras Dras. Ana Paula Kipnins-Junqueira e Izabel Miranda, pela prontidão em participar da avaliação deste trabalho e pela disponibilidade, atenção e contribuição com sugestões para a correção desta dissertação;

Aos meus amigos que participaram diretamente no meu trabalho: Deison Lima Soares, Juliana Issa Hori, Tatiana Schneider e Luciana Previato, pela amizade e ajuda incondicional.

A minha grande amiga e conselheira Marina Oliveira e Paula pela grande amizade e auxílio na fase final da minha dissertação.

A Carlos Rodrigo Zarate-Blades pela generosidade e dedicação que contribuíram diretamente na elaboração desse trabalho.

A Izaira Tincane, Brandão e Ana Paula Masson pela enorme capacidade de trabalho dedicado no auxílio dos experimentos realizados nessa dissertação e amizade em todos os momentos.

A secretária Ana Cristine Ferreira por ter me acolhido como uma mãe e pela sua constante preocupação com todos os alunos da área, cuidando como se todos fossemos seus filhos.

A Profa. Dra. Simone Gusmão Ramos, que colaborou diretamente no meu trabalho com o auxílio na compreensão da análise histológica e pela amizade e dedicação ao trabalho.

A técnica Elaine Medeiros Floriano, pela elaboração das lâminas histológicas do trabalho e pelos momentos de amizade e carinho.

A professora Maria Helena Santana e sua aluna Lucimara Gaziola de la Tore pela elaboração das construções lipossomais utilizadas nesse trabalho.

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva e através dele a todos os docentes da área da Imunologia Básica e Aplicada. A preocupação constante com a nossa formação como pesquisadores e o amor que transmitem no cuidado da excelência do nosso Programa não passa despercebida e serão sempre lembrados como exemplo na minha vida acadêmica.

Aos meus colegas de laboratório pela amizade e companheirismo em todos os momentos: Marina Singareti, Juliana I. Hori, Tatiana Schineider, Deison Soares, Giovanna dos Santos, Luciana Previato, Wendy Rios, Marina Singareti, Rogério Rosada, Fabiani Grantz, Ana Paula Trombone, Pryscilla F Wowk, Denise Fonseca, Luis Henrique Franco, Sheila Severino, Cássia A. Sergio, Tiago Malardo, Ana Flávia Gembre, Júlio Lorenzi, Wilson Schluchting, Carolina Damas, Mario Stábile, Rubens dos Santos, Fabio Galetti, Eduardo Dantas, Alexandra I. de Medeiros.

Especialmente a meus grandes amigos do Departamento de Fisiologia pessoas que me acolheram com muito carinho e afeto.

Pela amizade especial de Shirley Kátia de Almeida, Manuela da Mota Silveira, Giuliana Borges, Janaina Crispim, Jousimari Melo, Poliana Zoccal, Lílían Souza, Fernanda Barbosa.

A todos os amigos dos laboratórios dos professores Lúcia Facciolli, João Santana, Beatriz Rosseti e Isabel Miranda e amigos da pós-graduação pelo companheirismo e amizade.

Ao pessoal do Núcleo de Pesquisa em Tuberculose, cuja ajuda é imprescindível em nosso dia a dia: Helena, Rogério, Vanessa, Carlos, Ana e Marcos.

As agências financiadoras: Fapesp, Capes, Faepa, Cnpq, por permitir realizar um trabalho de qualidade através do fomento à pesquisa.

Obrigada a todos

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1- INTRODUÇÃO	1
1.1-Tuberculose	1
1.2- Resposta Imune na Tuberculose	1
1.3- Novas vacinas para Tuberculose	8
1.3.1- Vacinas com microorganismos vivos	9
1.3.2- Vacinas de subunidades	10
1.3.3- Vacinas de DNA	10
1.4- Otimização de vacinas de DNA	12
1.4.1- Vacinas de DNA encapsuladas em microesfera de PLGA	14
1.4.2- Administração de vacinas de DNA utilizando a estratégia de “Prime-Boost”	16
1.4.3- Vetorização passiva de vacinas de DNA por lipossomas catiônicos	18
2- HIPÓTESE	22
3- OBJETIVO GERAL	23
3.1- Objetivos Específicos	23
4-MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1- Vacina de DNA-Hsp65	24
4.1.1- Obtenção do plasmídeo	24
4.1.2- Avaliação da integridade do plasmídeo	25
4.2- Obtenção da Hsp65 recombinante (rHsp65)	26
4.2.1- Dosagem e Caracterização da Proteína	27
4.3- Microesferas de DNA-Hsp65: Encapsulamento e Caracterização	27
4.3.1- Encapsulamento do plasmídeo pVAX-Hsp65 juntamente com DMT em microesferas poliméricas biodegradáveis	27

4.3.2- Avaliação da eficiência do encapsulamento (“load”) do plasmídeo pVAX-Hsp65	28
4.4- Microesferas de proteína recombinante hsp65: Encapsulamento	
Caracterização	28
4.4.1- Encapsulamento da proteína Hsp65 recombinante em microesferas poliméricas biodegradáveis	28
4.4.2- Avaliação da eficiência do encapsulamento (“load”) da proteína Hsp65 recombinante	29
4.5- Determinação do diâmetro das Microesferas	29
4.6- Obtenção de construções lipossomais com DNA-HSP65	30
4.7- Teste para detecção de endotoxinas	30
4.8- Animais	31
4.9- Imunizações	31
4.10- Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem de anticorpos	32
4.11- Preparo do inóculo de M. tuberculosis	33
4.12- Desafio dos animais com M. tuberculosis	33
4.13- Avaliação do pulmão dos animais infectados	34
4.13.1- Coleta, digestão e obtenção das células do pulmão.	34
4.13.2- Determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC)	35
4.13.4- Ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de citocinas	35
4.13.5- Ensaio de ELISPOT para dosagem de citocinas	37
4.14- Análise histológica do pulmão	38
4.15- Análise morfométrica no tecido pulmonar	38
4.16- Análise estatística	39
4.16- Delineamento Experimental	40
5- RESULTADOS	41
5.1- Obtenção e caracterização do plasmídeo pVAX-Hsp65	41
5.2- Obtenção e caracterização da Hsp65 recombinante (rHsp65)	42

5.3- Preparo e caracterização das microesferas poliméricas biodegradáveis contendo o plasmídeo pVAX-Hsp65 juntamente com DMT e microesferas de PLGA contendo proteína recombinante HSP65 .	43
5.4- Quantificação de endotoxina bacteriana nas formulações vacinais	44
5.5- Produção de Anticorpos anti-Hsp65 específicos	45
5.6- Avaliação da resposta imune protetora induzida pelas diferentes estratégias de imunização contendo DNA-Hsp65	47
5.6.1- Detecção da produção de citocinas no pulmão	47
5.6.1.1-ELISA	47
5.6.2- Detecção de citocinas produzidas por células do pulmão	52
5.6.3- Recuperação de unidades formadoras de colônia (UFC) no pulmão de animais infectados	54
5.6.4 - Análise histopatológica do Pulmão	56
5.6.5- Análise Morfométrica do tecido pulmonar	60
6- DISCUSSÃO	62
7- CONCLUSÕES	74
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

ABREVIATURAS

- A/O:** Emulsão água em óleo
- A/O/A:** Emulsão água em óleo em água
- AIDS:** Acquired Immunodeficiency Syndrome – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- APC:** Antigen Presenting Cell – Célula Apresentadora de Antígeno
- BALT:** Bronchus-associated lymphoid tissue-Tecido linfóide associado ao brônquio
- BCG:** Bacilo de Calmette-Guérin
- BSA:** Bovine Seric Abum – Albumina Sérica Bovina
- CR:** Complement Receptor – Receptor de Complemento
- DC-SIGN:** Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin
- DMT:** Dimicolato de trealose
- DNA:** Deoxyribonucleic Ácid – Ácido Desoxiribonucléico
- DNA-Hsp65:** Vacina de DNA que codifica a proteína Hsp65 de *Mycobacterium leprae*
- ELISA:** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – Ensaio Imunoenzimático de Adsorção
- ESAT-6:** 6-kDa Early Secreated Antigen Target
- FcγR:** Receptor para a porção constante de IgG
- H37Rv:** Cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis* isolada de material humano
- HEL:** Hen Egg Lysozyme – Lisozima de Ovo de Galinha
- HIV:** Human Immunodeficiency Virus – Vírus da Imunodeficiência Humana
- Hsp65:** Proteína do choque térmico de 65kDa de *M. leprae*
- IFN-γ:** Interferon-gama
- Ig:** Immunoglobulin – Imunoglobulina
- IL:** Interleukin – Interleucina
- iNOS:** inducible Nitric Oxide Sintase
- ISCOM:** Immunostimulating Complexes – Complexos Imunoestimulatórios
- IPTG:** Isopropiltio-b-D-Galactosídeo
- J774:** Macrófagos de linhagem tumoral originários de camundongos BALB/c
- LAL:** Lisado de amebócito de *Limulus sp*
- LAM:** Liporabinomanan – Liporabinomanana
- LPS:** Lipopolissacarídeo
- MDR:** Multidroga resistente
- M. leprae:*** *Mycobacterium leprae*
- M. tuberculosis:*** *Mycobacterium tuberculosis*
- MHC:** Major Histocompatibility Complex – Complexo Principal de Histocompatibilidade
- NK:** Natural Killer
- NO:** Nitric Oxide – Óxido Nítrico

ODN: Oligodeoxynucleotides – Oligodeoxinucleotídeos

OPD: o-Phenylenediamine-Dihydrochloride

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

PBS: Phosphate Buffered Salin – Salina Tamponada com Fosfato

PLA: Polímero derivado do ácido láctico

PLGA: Co-polímero derivado dos ácidos poli-lático e glicólico

PRR: Pattern Recognition Receptors – Receptores padores de Reconhecimento

RD1: Region of Difference 1

RNA: Ribonucleic Acid – Ácido Ribonucleico

SCID: Imunodeficiência grave combinada

SPF: Specific Pathogen Free – Livre de Patógenos Específicos

SFB: Soro Fetal Bovino

TB: Tuberculose

TCR: T Cell Receptor – Receptor da Célula T

TGF: Tumoral Growth Factor – Fator de Crescimento Tumoral

Th: T helper – linfócito T auxiliar

Th1: Célula T auxiliar tipo 1

Th2: Célula T auxiliar tipo 2

TLR: Toll Like Receptors – Receptor do Tipo Toll

TNF- α : Tumoral Necrosis Factor – Fator de Necrose Tumoral

Tween: 20-polyoxyethylenesorbitan monolaurate

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

WHO: World Health Organization – Organização Mundial da Saúde

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do Grátículo.....	39
Figura 2. Perfil eletroforético do plasmídeo pVAX-Hsp65.. ..	41
Figura 3. Perfil eletroforético da proteína recombinante Hsp65 purificada.. ..	42
Figura 4. Determinação da produção de anticorpos no soro de camundongos BALB/c imunizados com diferentes estratégias vacinais.....	46
Figura 5. Produção de IFN- γ no homogenato pulmonar de camundongos BALB/c imunizados e desafiados com M. tuberculosis.. ..	
Figura 6. Produção de IL-12 no homogenato pulmonar de camundongos BALB/c imunizados e desafiados com M. tuberculosis.	50
Figura 7. Produção de IL-10 no homogenato pulmonar de camundongos BALB/c imunizados e desafiados com M. tuberculosis	51
Figura 8. Produção de IL-4 e IFN- γ por células do pulmão de camundongos BALB/c imunizados e desafiados com M. tuberculosis.	53
Figura 9. Número de unidades formadoras de colônia (UFC) no pulmão de camundongos BALB/c imunizados e desafiados com M. tuberculosis.....	55
Figura 10. Cortes histológicos do pulmão de camundongos BALB/c imunizados e desafiados com M. tuberculosis (aumento original 50X)	57
Figura 11. Cortes histológicos do pulmão de camundongos BALB/c imunizados e desafiados com M. tuberculosis (aumento original 200X).. ..	58
Figura 12. Cortes histológicos do pulmão de camundongos BALB/c imunizados e desafiados com M. tuberculosis.(Aumento original 400X).....	59
Figura 13. Análise morfométrica do infiltrado inflamatório no pulmão de camundongos BALB/c imunizados e desafiados.....	61

RESUMO

O número crescente de casos de tuberculose (TB) revela a situação alarmante dessa doença. As estatísticas mostram que a TB permanece como uma das maiores causas de mortalidade devido a doenças infecciosas no mundo. Apesar da vacina de uso corrente, BCG, proteger contra as formas mais graves de TB durante a infância e TB extrapulmonar, a eficácia da mesma pode variar de 0 a 80% dependendo da população estudada. Diante desse quadro em que se encontra a população mundial perante à TB, somado às dificuldades das estratégias de controle, a otimização de recursos preventivos e terapêuticos para essa doença torna-se imprescindível. A vacina gênica DNA-Hsp65 descrita pelo nosso grupo tem mostrado propriedades profiláticas e terapêuticas contra a TB experimental quando administrada na forma de solução salina (DNA nu) por via intramuscular em quatro doses de 100 µg cada uma. O presente trabalho teve como objetivo a otimização dessa vacina visando seu uso clínico. Assim, foram utilizadas formulações baseadas em sistemas de liberação controlada como os lipossomas e as microesferas, bem como estratégias de “prime-boost”. Observamos que independentemente das estratégias vacinais utilizadas, houve um aumento significativo das citocinas IL-12 e IFN- γ quando os animais imunizados com as formulações citadas foram desafiados subsequentelemente com *M. tuberculosis*, assim como a diminuição de IL-4 e IL-10, indicando um perfil de resposta Th1 associado com uma resposta efetiva contra a infecção por *M. tuberculosis*. Observamos também a diminuição significativa do número de unidades formadoras de colônias em todos os grupos experimentais. Além disso, é importante ressaltar que o estudo histopatológico, incluindo a análise morfométrica, revelou a preservação do parênquima pulmonar e redução do infiltrado inflamatório nos grupos imunizados com as diferentes formulações. Dessa forma, as novas estratégias vacinais empregadas neste trabalho demonstram otimização da utilização de nossa vacina de DNA, uma vez que permitem reduzir a quantidade de DNA inoculado e o número de doses administradas mantendo a mesma eficácia protetora obtida com o DNA nu. Dentre essas, a formulação empregando lipossomas parece ser a mais promissora das estratégias, pois utiliza menor quantidade de DNA, seus componentes são de fácil acesso e já estão liberados para uso em humanos. No entanto, como a formulação baseada na utilização de microesferas utiliza estruturas que liberam o antígeno por um período mais prolongado do que os lipossomas, deve-se considerar a possibilidade delas ativarem uma resposta imune mais duradoura. Finalmente, esses resultados abrem perspectivas promissoras de utilização dessas estratégias para o uso clínico dessa vacina.

ABSTRACT

The increased number of tuberculosis cases (TB) reveals an alarming situation and TB is among the main causes of mortality due to infectious disease. Although during infancy the BCG vaccine protects against serious kinds of TB, as well as extra-pulmonary TB, its efficacy can vary from 0 to 80%, depending on the studied population. Since there are difficulties in the application of current control strategies, the development of new preventive and therapeutical approaches becomes necessary. The genetic vaccine DNA-Hsp65, described by our group, has demonstrated prophylactic and therapeutical properties in experimental TB. In the present study, we evaluated liposome and microsphere releasing systems as well as the prime-boost strategy in attempt to optimize our DNA vaccine efficacy. This way, we observed that in all experimental groups, there were increased levels IL-12 and IFN- γ cytokines, which are associated with the protective response to *M. tuberculosis*. Additionally, IL-4 and IL-10 levels were decreased in these groups, indicating a Th1 pattern of response. Besides that, we observed a reduction in colony forming units in lungs from the experimental groups when compared to the controls. Therefore, the new strategies evaluated in this study demonstrate an optimization of our DNA vaccine utilization; since we obtained the same protection efficacy of the naked DNA with a less quantity of the injected DNA and a reduced number of doses. Moreover, among the tested formulations, the liposome strategy seems to be the most promising, since it demands the lowest quantity of DNA and its components are already approved for human application. Nevertheless, microspheres formulation uses delivery controlled system of the antigen, therefore, it should be taken into account that microspheres possibly induce a long lasting immune response against TB. Taken together, these results show new promising perspectives of the clinical utilization of these vaccinal strategies.

1- INTRODUÇÃO

1.1-Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* e consiste em um dos mais graves problemas de saúde pública da atualidade. As estatísticas mostram que a TB permanece como uma das maiores causas de mortalidade por doenças infecciosas no mundo, juntamente com HIV/AIDS (do inglês "Human Immunodeficiency Virus", "Acquired Immunodeficiency Syndrome") e malária (WHO 2005; VON REYN & VUOLA, 2002; ANDERSEN, 2001). Na última década, 90 milhões de novos casos surgiram e resultaram em aproximadamente 30 milhões de mortes (KAUFMANN, 2001). O Brasil ocupa o 15º lugar entre os 22 países nos quais se estima que ocorram 80% dos casos de TB no mundo (WHO 2005).

Apesar da existência de drogas que geralmente são eficientes para o combate da TB, o número de pacientes portadores de cepas multi-drogas resistentes tem aumentado nos últimos anos (WHO 2005; ZHU *et al.*, 2005). A re-emergência da TB pode ser atribuída a fatores como: o declínio nas condições de vida de grande parcela da população mundial; a diminuição significativa dos recursos destinados ao controle desse tipo de moléstia nos países em desenvolvimento; epidemia da AIDS; problemas ligados ao tempo relativamente longo (6 meses) da terapia disponível atualmente; (RIEDER 2005; NUNN *et al* 2005). Além disso, a profilaxia da TB que é realizada pela administração da vacina BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) que foi desenvolvida pelos pesquisadores Albert Calmette e Camille Guérin no Instituto Pasteur em 1921, permanece controversa devido à variação na sua eficácia protetora (FINE 1999; ORME ;KAUFMANN 2006).

1.2- Resposta Imune na Tuberculose

M. tuberculosis é um bacilo intracelular aeróbico de crescimento lento, o que justifica a demora no diagnóstico microbiológico da doença. (NOLTE & METCHOCK, 1995; HOLT *et al.*, 1994, revisto por KAUFMANN 2001). A transmissão da TB ocorre pela inalação de

partículas de aerossol, que são expelidas por indivíduos com a doença clinicamente ativa (RILEY *et al.*, 1959, DOHRETY & ANDERSEN, 2005). *M. tuberculosis*, após ser inalado, interage com macrófagos alveolares e células dendríticas presentes nas vias aéreas e, embora possa infectar diversos órgãos (ossos, rins, etc.), a infecção pulmonar é a mais comum (FLINN & CHAN, 2001; FLINN & CHAN, 2005). O estabelecimento da mesma depende de vários fatores, como o número e a virulência dos bacilos inalados, a duração da exposição ao bacilo, além da condição imunológica e de características genéticas do indivíduo exposto (DANNENBERG, 1989). Apesar das estatísticas mostrarem que grande parte da população mundial já entrou em contato com o bacilo, uma parcela relativamente pequena dos indivíduos desenvolve a doença. Cerca de 10% dos indivíduos que entram em contato com o bacilo desenvolvem a TB primária ou doença ativa e podem transmitir a doença para outros indivíduos (YOUNG & STEWART 2002; WHO, 2004). A resposta imune desencadeada após o contato com o patógeno é eficiente em impedir a multiplicação do bacilo na grande maioria das pessoas infectadas (aproximadamente 90%), as quais desenvolvem uma forma latente e assintomática da infecção. Uma pequena porcentagem desses indivíduos (5 – 10%) pode apresentar reativação da infecção, que poderia ser decorrente de um quadro de imunossupressão, causado por diversos fatores, entre eles: infecção por HIV, desnutrição, tratamento prolongado com corticóides e abuso de álcool e drogas (ROOK *et al.*, 2005b; FLYNN & CHAN, 2005; BOOM *et al.*, 2003).

A resposta imune desencadeada na TB é bastante complexa e muitos componentes do sistema imune estão envolvidos tanto na proteção, quanto na imunopatologia da doença. O estabelecimento da infecção pela micobactéria depende de seu encontro inicial com as células do hospedeiro no caso, os macrófagos alveolares, que são o habitat preferencial do bacilo, e as células dendríticas presentes nas vias aéreas. Esta interação ocorre por meio dos receptores de reconhecimento de padrões moleculares, tais como receptores do sistema complemento (CR1, CR2, CR3 e CR4), receptores de manose, CD14 (ERNEST, 1998) e receptores do tipo Toll (do inglês “Toll Like Receptors”), expressos na superfície celular, com os padrões moleculares associados à patógenos, PAMPs (do inglês “Pathogen

Associated Molecular Pattern”) expressos na superfície do *M. tuberculosis* (FLYNN *et al.*, 2005; ABEL *et al.*, 2005; DRENNAN *et al.*, 2004; KAUFMANN & SHAIBLE, 2003). Uma via alternativa de infecção pelo bacilo ocorre, via um receptor tipo lectina presente na superfície de células dendríticas, o DC-SIGN ou CD209, que se liga a uma lipoarabinomanana da micobactéria. DC-SIGN desencadeia efeitos anti-inflamatórios, mas as consequências dessas interações para o bacilo são desconhecidas (HERRMANN & LAGRANGE, 2005). Alguns autores propõem que a adaptação do patógeno à célula alvo e a sua sobrevivência no hospedeiro poderiam ser auxiliadas pelo DC-SIGN (VAN KOOYK & GEIJTENBEEK, 2003).

Após a fagocitose do bacilo pela célula do hospedeiro, diversos mecanismos microbicidas são desencadeados como: liberação de enzimas lisossomais durante a fusão do fagossoma ao lisossoma; geração de intermediários reativos do oxigênio (ROIs), e do nitrogênio (RNIs) que são tóxicos para o bacilo; secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1, MCP-3, IP10, RANTES, MIP1- α e MIP2, resultando no recrutamento de leucócitos para o local da infecção. Inicialmente, ocorre a migração de neutrófilos para o sítio da infecção, seguidos de monócitos, que se diferenciam em macrófagos, e de precursores de células dendríticas. (COSMA *et al.*, 2004; KAUFMANN, 2003; ORME, 2003; FLYNN & CHAN, 2001; DANNENBERG, 1993; ADAMS, 1976). Dentre estas células, os macrófagos são descritos como essenciais para indução da resposta imune contra TB, pelo fato de serem as células que contêm os bacilos e também por exercerem funções microbicidas ao produzirem ROI e RNI. Além disso, os macrófagos atuam como células apresentadoras de antígenos e ativam a resposta imune adaptativa (FLYNN *et al.*, 2004; FLYNN *et al.*, 2001; COOPER *et al.*, 2000).

Apesar do macrófago ser caracterizado como uma célula efetora primária, *M. tuberculosis* desenvolveu diversos mecanismos que permitiram sua sobrevivência e replicação no microambiente interno desta célula. Deste modo, a ativação inicial dos macrófagos pelos bacilos, na maioria das vezes, é insuficiente para eliminá-los e o controle da infecção requer a ativação da resposta imune celular específica, principalmente dos

linfócitos T (FLYNN & CHANN, 2005; FLYNN *et al.*, 2004; BROWN & TAFFET, 1995; CLEMENS & HORWITZ, 1993). Os macrófagos infectados por micobactérias liberam citocinas como a IL-12 (ALTARE *et al.*, 1998), IL-18 (SUGAWARA *et al.*, 1999) e IL-23 (OPPMANN *et al.*, 2000) as quais ativam linfócitos, que por sua vez podem ativar outros macrófagos pela produção de IFN- γ (JOUANGUY *et al.*, 1996) e TNF- α (FLYNN *et al.*, 1995). Esta resposta é muito importante para limitar o crescimento e eliminar o bacilo. A importância de células T foi ilustrada por DOHERTY e SHER (1997), que mostraram aumento da susceptibilidade à infecção por *Mycobacterium avium* em animais desprovidos de células T maduras (camundongos nude). Além disso, animais deficientes tanto na resposta de células T quanto na produção de anticorpos (camundongos SCID) também se mostraram mais susceptíveis à infecção (LAI *et al.*, 1997).

A importância de linfócitos T CD4+ na imunidade contra TB humana foi evidenciada em pacientes infectados com HIV, os quais apresentaram maior susceptibilidade a essa doença provavelmente pela grande diminuição no número de linfócitos T CD4+ circulantes (LAI *et al.*, 1997). O recrutamento de linfócitos T CD4+ é essencial para o desenvolvimento da imunidade protetora durante a infecção, uma vez que o habitat preferencial das micobactérias nos macrófagos é o fagossomo, o que resulta na apresentação de antígenos preferencialmente complexados às moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês Major Histocompatibility Complex) e na ativação desta população de linfócitos (FENTON *et al.*, 1997). Além disso, pode ocorrer apresentação de antígenos via moléculas de classe I do MHC, ativando células T CD8+ (Revisto por SILVA *et al.*, 2001).

A importância da subpopulação de linfócitos T CD8+ nas infecções micobacterianas foi descrita nos últimos anos por vários autores. Os mecanismos efetores desencadeados pela ativação das células T CD8+ parecem prolongar a sobrevivência de animais infectados, pois na sua ausência os camundongos tornavam-se mais suscetíveis à infecção, principalmente nos pulmões (FLYNN, 1992). É sabido ainda que células T CD8+ de camundongos infectados produzem IFN- γ em resposta ao reconhecimento de antígenos de

M. tuberculosis apresentados por células dendríticas ou macrófagos (SERBINA & FLYNN 1999, BONATO *et al.*, 1998). Sugere-se que a lise de macrófagos infectados por linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos provoque a liberação de vesículas apoptóticas contendo os bacilos, que podem ser eliminadas após a fagocitose por outros macrófagos ativados (ORME, 1992). Os mecanismos de lise e citotoxicidade mediados pelos linfócitos T CD8⁺ ocorrem tanto pela via que envolve a exocitose de grânulos contendo perforina e granulicina, ou pela via que requer a interação de CD95 com seu ligante (BROOKES *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2001; SERBINA *et al.*, 2000; STENGER *et al.*, 1998).

Células T “não convencionais” também podem estar envolvidas na resposta ao bacilo. Estas células podem ser linfócitos T $\gamma\delta$, específicos para fosfoantígenos micobacterianos, ou células NKT, que reconhecem antígenos apresentados pela molécula CD1, assim como células T CD4⁻/CD8⁻ (ou duplo negativas) (STENGER & MODLIN, 1999, Revisto por ELIAS *et al.*, 2006). Células T $\gamma\delta$ ativadas por monócitos infectados com *M. tuberculosis* secretam IFN- γ , potencializando a ação microbicida de macrófagos infectados e podem assim controlar a replicação da bactéria (DIELI *et al.*, 2001). Além disso, recentemente foi demonstrado que este tipo celular é a principal fonte de IL-17 logo no início da infecção por *M. tuberculosis* o que sugere que este tipo celular seja importante para a resposta protetora contra o bacilo (LOCKHART *et al.*, 2006).

A produção de citocinas no decorrer da infecção é de extrema importância para a resolução da doença. A produção de IL-12 é induzida após a fagocitose do bacilo pelos macrófagos ou por células dendríticas, que estimulam a produção de IFN- γ por outras células, como os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, células “natural killer” (NK) e os próprios macrófagos infectados (FENTON *et al.*, 1997). A produção dessa citocina é essencial para uma ativação eficiente dos macrófagos e tem um papel crucial no controle da infecção pela micobactéria (COOPER *et al.*, 1993; FLYNN *et al.*, 1993; SALGAME, 2005). SERBINA & FLYNN (1999) descreveram que as células T CD4⁺ e T CD8⁺ se destacam na produção de IFN- γ durante a infecção, porém os linfócitos T CD4⁺ são os responsáveis pela maior parte

dessa produção na fase inicial da doença. Agindo em sinergismo com o IFN- γ na fase aguda da doença o TNF- α , secretado principalmente por macrófagos, células dendríticas e linfócitos T, possui importante papel no controle da TB (FLYNN *et al.*, 1995; ROOK *et al.*, 2005^a). Essa citocina modula a migração celular, influenciando a expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas, o que contribui para a formação e manutenção do granuloma (Revisto por SALGAME, 2005).

O granuloma é uma estrutura importante, pois restringe a proliferação da bactéria e previne a disseminação da infecção (BEAN *et al.*, 1999; NAU *et al.*, 1997). Esta estrutura consiste num aglomerado de macrófagos rodeados por linfócitos e fibroblastos que morrem e são repostos por novas células constantemente. Apesar de não serem consideradas importantes na defesa contra a TB, as células B, presentes em grande número no granuloma humano ou de camundongos, contribuem para a patologia e formação dos granulomas por meio da liberação de citocinas e quimiocinas.

Existem importantes evidências de que a manutenção do ambiente imunológico no granuloma é essencial para a prevenção da reativação de bacilos latentes. Entretanto, a exata natureza das respostas imunológicas que norteiam a reativação da infecção ainda não foi completamente esclarecida (Revisto por SALGAME, 2005). No entanto, a formação granulomatosa não é capaz de eliminar o bacilo, apenas o mantém isolado. Em indivíduos imunossuprimidos, nos quais o equilíbrio entre o sistema imune do hospedeiro e o patógeno é quebrado, ocorre a reativação e, muitas vezes, a disseminação da doença (SILVA *et al.*, 2001). Para isso acontecer, é necessária a ruptura da cápsula do granuloma que contém os bacilos, que pode ser provocado pela necrose de células infectadas devido ao aumento da liberação de enzimas lisossômicas as que por sua vez atuam sobre a cápsula do granuloma (DHEAD, K *et al.*, 2005).

A necrose pode ocorrer em resposta a componentes micobacterianos não tóxicos e não viáveis indicando que citocinas e enzimas do próprio hospedeiro são responsáveis por esse processo patológico. Dentre essas o TNF- α que é essencial para a resposta imune contra a TB como já foi descrito, está associado também com a imunopatologia provocada

pelo bacilo. Esse fenômeno pode acontecer possivelmente pelo fato do TNF- α aumentar a produção de metaloproteinases que facilitam a proteólise de elementos da estrutura pulmonar (DHEAD, K et al, 2005, Revisado por FLYNN & SHAN, 2001). É necessário, portanto, que exista um balanço entre a ativação da resposta imune e o controle da mesma. Nesse contexto, apesar da grande maioria dos trabalhos ressaltarem a importância de uma resposta imune do tipo Th1 para proteção contra TB, têm-se discutido o papel da resposta do tipo Th2 na regulação da resposta contra essa doença. A hipótese baseia-se na idéia de que o contato prévio com micobactérias ambientais ou helmintos (comum em países em desenvolvimento) gera respostas de padrão Th2 caracterizado pela produção da citocina IL-4, que suprimiria a resposta Th1 caracterizada pela produção de IFN- γ e TNF- α . Nesse caso IL-4 promoveria a inativação do macrófago, favoreceria o crescimento bacteriano e promoveria o desenvolvimento de efeitos tóxicos por TNF- α , resultando em dano tecidual com fibrose pulmonar.

Diante desses fatos acredita-se que para o desenvolvimento de vacinas para TB é necessário levar em consideração a indução de mecanismos que promovam a resposta Th1 quanto inibir a resposta Th2 (ROOK *et al* 2005). A citocina IL-10 que é importante na regulação dessa resposta é produzida por macrófagos e células dendríticas após interação com alguns componentes da micobactéria. Além disso, linfócitos T ativados também produzem IL-10. Essa citocina modula negativamente a resposta inflamatória e inibe a proliferação de células T, a produção de IL-12 e IFN- γ (ROJAS *et al.*, 1999; De WAAL MALEFYT *et al.*, 1991; FIORENTINO *et al.*, 1991).

A compreensão da regulação da resposta imune durante a infecção natural torna-se essencial para o desenvolvimento de estratégias, como novas vacinas e imunoterapias, que permitam intervir na resposta contra *M. tuberculosis*. Uma nova vacina contra a TB deverá estimular uma resposta imune, com indução de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória, mais eficiente que aquela induzida pela infecção natural e associada com a produção de IFN- γ , IL-12, TNF- α e inibição de IL-4. Além disso, é preciso que haja produção de citocinas

regulatórias, como IL-10 e TGF- β , para que a forte resposta celular induzida não provoque lesões, ou mesmo necrose, no tecido pulmonar.

1.3- Novas vacinas para Tuberculose

A vacina usada atualmente contra a TB é a BCG, que consiste de *Mycobacterim bovis* atenuado. Estima-se que mais de 2,5 bilhões de pessoas já tenham sido vacinadas com BCG (MARTÍN, 2005). Esta vacina, administrada em dose única, se mostra vantajosa pelo fato de ser uma preparação vacinal que pode ser considerada segura e por estimular o desenvolvimento de memória imunológica de longa duração, variando de 5 a 50 anos. Em geral ela é administrada ao nascimento, apresenta estabilidade ao calor na forma liofilizada e, sobretudo, é uma vacina cuja produção requer baixo custo (MARTÍN, 2005; O'DONNELL, 1997). Além disso, o BCG protege contra as formas mais graves de TB durante a infância, TB extrapulmonar e meningite por TB, e também contra a hanseníase (MARTÍN, 2005).

Apesar disso, a eficácia do BCG pode variar de 0 a 80%, dependendo da população estudada (ORME 1998). A variabilidade na proteção conferida por essa vacina está associada a vários fatores, como o contato prévio com micobactérias ambientais, principalmente nas regiões tropicais, as características genéticas das diferentes populações vacinadas, e o fato do BCG ser produzido por laboratórios de diferentes países com uso de diferentes cepas. Adicionalmente, o fato dessa vacina estar mantida em cultura há muitos anos, levou à perda de segmentos gênicos com potencial imunogênico (MARTÍN, 2005; BRITTON & PALENDIRA, 2003; VON REYN & VUOLA, 2002; BRANDT *et al.*, 2002, BEHR, 2001). Além disso, a vacina BCG interfere nos testes de sensibilidade para detecção da doença, não apresenta proteção adicional com a administração de reforços da vacina e não é totalmente segura para indivíduos com AIDS, por ser uma vacina constituída de microrganismos vivos (BRITTON & PALENDIRA, 2003; HESS & KAUFMANN, 1999).

Diante do quadro em que se encontra a população mundial perante a TB, somado à ineficácia das estratégias de controle, a otimização de esquemas preventivos e terapêuticos para essa doença torna-se imprescindível.

1.3.1- Vacinas com microorganismos vivos

As vacinas compostas de microorganismos vivos são uma alternativa interessante de imunização, pois induzem uma resposta imunológica celular e humoral, que pode ser de longa duração. Além disso, não necessitam de adição de adjuvante uma vez que os próprios componentes da bactéria possuem este papel. No entanto elas oferecem alguns riscos, como reversão de virulência ou possível indução de patologia mediante situações de imunossupressão (ALPAR *et al*, 2005). As primeiras tentativas para o desenvolvimento de nova vacina contra TB envolviam o uso de microrganismos atenuados ou mortos (SMITH, 1985). No entanto essas vacinas induziam intensa resposta inflamatória prejudicial ao hospedeiro e tanto a eficácia quanto a durabilidade destas preparações foram questionadas (ORME, 1988).

Outra estratégia de imunização envolve o uso de BCG recombinante. Neste caso, são inseridos na micobactéria genes que codificam determinadas proteínas e dentre elas estão os de citocinas ou antígenos imunodominantes de *M. tuberculosis* (MARTÍN, 2005; REED & LOBET, 2005). Entre as várias cepas de BCG recombinantes, que são candidatas a novas vacinas encontram-se o rBCG30, que expressa o antígeno 85B (Ag85B) de *M. tuberculosis*, que em modelo experimental murino mostrou efetiva proteção contra TB e entrou para os testes clínicos de fase I no início de 2004. Outra vacina candidata contra TB é o BCG RD1, uma cepa de BCG na qual foram inseridos genes do complexo RD1 de *M. tuberculosis* e também demonstrou proteção contra a doença em modelo experimental. A BCG Δ ure-Hly demonstrou um aumento na eficácia da BCG original, uma vez que essa vacina expressa a proteína listeriolisina de *Listeria monocytogenes* e é deficiente da enzima urease. Esse gene seria importante para promover o escape dos bacilos do fagossomo para o citosol da célula do infectada e por essa característica poderia induzir resposta de células T CD8+, associadas à proteção contra a doença (HORWITZ & HARTH, 2003; GRODE *et al.*, 2005).

1.3.2- Vacinas de subunidades

As vacinas de subunidades consistem no uso de um ou mais componentes da micobactéria, os quais podem ser elementos da parede do bacilo, filtrados de cultura ou moléculas secretadas, como proteínas, carboidratos, lipoglicoproteínas e glicolipídeos (revisto por REED & LOBET, 2005). As estratégias utilizadas para a administração das vacinas de subunidade envolvem desde a simples injeção do antígeno acrescido de adjuvante, até o uso de vacinas gênicas. Com o seqüenciamento do genoma de *M. tuberculosis* (COLE *et al.*, 1998), surgiu a possibilidade de caracterização de inúmeros antígenos imunogênicos e/ou imunodominantes como promissores candidatos ao desenvolvimento de vacinas. Dentro deste contexto, as vacinas de subunidades testadas contra TB, apesar de serem consideradas seguras, exigiam alto custo de produção. Além disso, algumas dessas formulações revelaram-se pouco imunogênicas, sendo necessária a administração de doses adicionais, ou reforços, e utilização de adjuvantes eficazes que promovam o desenvolvimento de resposta celular (HAN *et al.*, 2002). Desse modo, há uma grande dificuldade de ativar a resposta imune adequada sem a indução de processos inflamatórios persistentes, uma vez que é comum observar ulcerações após a vacinação com a maioria dos adjuvantes conhecidos (BOMFORD, 1998).

1.3.3- Vacinas de DNA

Avanços recentes no entendimento da captura de antígenos pelo sistema imune têm fornecido a base para o desenho racional de formulações que têm sido utilizadas como vacinas e terapias. Dentre as diferentes propostas surgidas ultimamente, os DNAs plasmidiais (vacinas de DNA) (GURUNATHAN *et al.*, 2000), apresenta-se como um método para a geração de uma forte resposta imune humoral e celular (HUYGEN *et al.*, 1996). Estas vacinas são compostas de plasmídeos carreando o gene do antígeno de interesse, sendo capazes de dirigir a síntese do mesmo após entrada na célula hospedeira. Essa é uma estratégia interessante, visto que o antígeno é produzido pelo próprio hospedeiro não sofrendo

problemas relacionados à estabilidade e, além disso, o DNA apresenta uma propriedade adjuvante inerente que pode ser atribuída à capacidade imunoestimulante de determinadas seqüências de oligonucleotídeos (motivos CpG) presentes na sua estrutura (KRIEG, 2001). Outro ponto importante desta estratégia consiste na capacidade das vacinas de DNA em estimular células T CD8+, uma vez que o antígeno é gerado pela própria célula, podendo ser processado e conjugado a MHC de classe I (SILVA *et al.*, 1996). As vacinas de DNA têm sido estudadas em diferentes patologias utilizando diferentes modelos de infecção experimental entre eles: camundongos (SILVA *et al.*, 1999), primatas não humanos (SIMMONS *et al.* 2006; BAROUCH *et al.*, 2000), e em ensaios clínicos (WANG *et al.*, 1998).

Estudos do Núcleo de Pesquisas em Tuberculose (NPT) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (FMRP-USP), com vacinas de DNA mostraram que um único antígeno, a proteína de choque térmico de 65 kDa de *M. leprae* (hsp65), é suficiente para induzir proteção efetiva contra um desafio subsequente com cepa virulenta de *M. tuberculosis* em modelo experimental murino. Esses estudos demonstraram que tanto a transferência adotiva de células transfectadas com DNA-Hsp65 (J774-Hsp65), quanto a própria vacinação com DNA-Hsp65 *nu* por via intramuscular, são capazes de promover uma resposta específica contra a proteína hsp65 por meio de células T CD8⁺ citotóxicas e células T CD4⁺ de padrão Th1, estando essas associadas à proteção contra a infecção por *M. tuberculosis* (LOWRIE *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 1996; BONATO *et al.*, 1998, SILVA *et al.*, 1999, LOWRIE *et al.*, 1999). O efeito profilático desta vacina de DNA estava associado com a produção de IFN- γ por linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ que expressavam altos níveis do receptor de adesão CD44, sendo o efeito protetor semelhante ao conferido pela vacina BCG, o mesmo não foi observado para o vetor sem o gene Hsp65 (SILVA *et al.*, 1999; BONATO *et al.*, 1998).

A vacina DNAHSP65 foi desenhada, inicialmente, para uso como vacina profilática contra a TB, mas, durante as etapas de pesquisa e desenvolvimento observou-se que ela também apresentava atividade imunoterapêutica contra a doença já estabelecida. Foi o

primeiro produto publicado na literatura com atividades de “vacina terapêutica”. Os resultados iniciais do nosso grupo, publicados na revista *Nature* em 1999 (LOWRIE *et al*, 1999) mostraram que o DNA-Hsp65 pode curar os casos crônicos de TB, a doença disseminada, a TB latente e a TB-MDR. Verificou-se também uma redução significativa no número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) nos pulmões dos animais infectados por via intratraqueal e tratados com DNA-Hsp65 os quais apresentaram maior produção de IFN- γ e TNF- α e maior preservação do parênquima pulmonar em relação aos animais infectados e não tratados (BONATO *et al.*, 2004). Além disso, quando administrada, em conjunto, com quimioterápicos antibacterianos convencionais, em animais que foram previamente infectados com cepas de *M. tuberculosis*, essa formulação provocou uma rápida diminuição no pulmão das UFC (SILVA, *et al.*, 2005). Por outro lado, para que a Hsp65 administrada na forma de proteína recombinante induzisse um padrão similar de resposta imune em modelo experimental, foi necessária a sua veiculação em carreadores lipossomais a fim de permitir a sua liberação no espaço intracelular (LIMA *et al*, 2001). Sendo assim fica evidente que a proteção para a TB experimental está associada à forma como o antígeno é apresentado ao sistema imune. Estudos realizados pelo nosso grupo utilizando a vacina de DNA-Hsp65 com dimicolato de trealose (DMT) veiculada em microesferas de ácido láctico e glicólico (PLGA do inglês “poli D, L-lático-co-glicólico”) mostraram que essa formulação foi eficaz em proteger camundongos infectados com *M. tuberculosis* (LIMA *et al*, 2003) e também naqueles infectados com *Leishmania major* (COELHO *et al*, 2006). Essa resposta foi observada possivelmente pela homologia entre os antígenos de *Leishmania* e de *Mycobacterium* que pode ter contribuído para o reconhecimento de epitopos antigênicos comuns (COELHO *et al*, 2006).

1.4- Otimização de vacinas de DNA

A otimização das vacinas de DNA representa o objetivo principal de muitos pesquisadores que procuram melhorar a eficácia e segurança dessas vacinas. Isso devido a baixa immunoestilação observada em animais de grande porte o que pode ser determinada

pela baixa transfecção das células (Revisado por PUTNAM, 2006). Apesar da eficácia da vacina de DNA-Hsp65 contra a TB, o uso clínico dessa vacina só será viável após uma otimização que permita reduzir a dose de DNA-Hsp65, número de imunizações e melhorar a transfecção das células do sistema imune. Isto pode ser realizado com a utilização de novos sistemas de liberação de antígenos. As técnicas mais usuais para realizar a imunização de DNA plasmideal são: injeção intramuscular do DNA livre de qualquer formulação (“naked” DNA ou “nu”) e biobalística (“gene gun”).

O “gene gun” consiste na transfecção de DNA plasmideal adsorvido em partículas de ouro (2 a 5 µm de diâmetro), que são aceleradas por uma descarga de alta pressão e direcionadas contra a epiderme, atingindo o tecido alvo (LEIFERT *et al.*, 2004). Embora esse método exija uma quantidade de plasmídeo 100 vezes menor que a injeção intramuscular, para gerar uma expressão antigênica equivalente (BARRY & JOHNSTON 1997), esse tipo de imunização geralmente leva a um padrão de resposta Th2 (BEMBRIDGE *et al.*, 2000). A veiculação da vacina contra a TB desenvolvida pelo NPT (pcDNA3-hsp65) via “gene gun” também induziu um padrão de resposta do tipo Th2, não conferindo a proteção anteriormente desencadeada pela imunização intramuscular (LIMA *et al.*, 2003).

Embora a injeção intramuscular seja um processo simples e de baixo custo, sua utilização, na maioria das vezes, requer uma quantidade elevada de DNA plasmideal para estimular uma resposta imune adequada. Isso porque o DNA livre de qualquer formulação pode ser degradado por endonucleases “in vivo”. Neste contexto, a utilização de carreadores como microesferas e lipossomas para vacinas de DNA, têm merecido grande destaque (LIU, 2003). A potencialidade destes sistemas deve-se principalmente à proteção do plasmídeo encapsulado contra a ação das nucleases, o que possibilita uma redução na dose, e à interação com células do sistema mononuclear fagocitário, pois são partículas com diâmetro inferior a 10 µm e, portanto, facilmente fagocitadas (ELDRIDGE *et al.*, 1991). Essas características contribuem para a ativação adequada da resposta imune. Além

desses sistemas de liberação controlada outra estratégia descrita para otimização das vacinas de DNA é a imunização heteróloga ou “Prime-boost”. Esta estratégia tem como objetivo melhorar a resposta imune celular induzida pela vacina de DNA, melhorando assim a resposta contra o patógeno (MCSHANE & HILL 2005).

1.4.1- Vacinas de DNA encapsuladas em microesfera de PLGA

Dentre os sistemas carreadores utilizados atualmente, destaca-se o encapsulamento do DNA em microesferas compostas por polímeros de PLGA. Esses compostos possuem potencial para atuar como mediadoras da transfecção de células fagocíticas como o macrófago e células dendríticas, além de proteger o DNA contra degradação biológica por endonucleases aumentando assim a taxa de transfecção (WANG *et al* 1999, RUBERTI *et al* 2004). As microesferas de PLGA são compostas de material biodegradável e biocompatível, já que são substratos inócuos ao organismo, sendo metabolizados via ciclo do ácido cítrico (PANYAM & LABHASETWAR, 2003 P). Além disso, esses polímeros já são utilizados para fins cirúrgicos na composição de fios de sutura e de implantes, estando caracterizados e aprovados para uso em humanos (HANANUSA *et al.*, 1995; MATSUSE *et al.*, 1995; MOONEY *et al.*, 1997; EISELT *et al.*, 1998; CAI *et al.*, 2005).

Outra característica fundamental para a adjuvanticidade das microesferas é o estabelecimento de uma vetorização passiva para células fagocitárias. Isto ocorre porque esferas com diâmetro na faixa de 1 a 10 μm são muito grandes para entrarem nas células por endocitose sendo então fagocitadas por células, como macrófagos, por exclusão de tamanho. Estas células que fazem parte do sistema fagocitário mononuclear são também as células apresentadoras de antígenos profissionais. Deste modo, o encapsulamento do antígeno em microesferas favorece o seu contato com as células do sistema imune. Já as partículas com diâmetro superior a 10 μm seriam responsáveis pela formação do depósito e liberação do antígeno por um período prolongado (CLELAND, 1995; O'HAGAN *et al*, 1993).

As microesferas de PLGA apresentam grande aplicabilidade no campo da vacinação com DNA, uma vez que ela pode ser projetada para liberar quantidades do plasmídeo de forma contínua e/ou rápida (ELDRIDGE *et al.*, 1991; JIANG *et al.*, 2005). A velocidade de hidrólise de tais polímeros depende: de sua composição química; da proporção dos monômeros; do tamanho da cadeia e do tamanho das partículas, podendo-se obter tempos de degradação que variam entre 2 semanas e 24 meses aproximadamente (ELDRIDGE *et al.*, 1991). A combinação da difusão através de poros e da erosão da matriz polimérica permite controlar a taxa de liberação do antígeno encapsulado nas microesferas. Esta propriedade permitiu a criação do conceito de vacina de dose única onde uma formulação composta por microesferas de tamanho, porosidade e composição polimérica diferentes, liberaria o antígeno encapsulado em intervalos de tempo que mimetizariam as doses de reforço de uma vacina (KHON *et al.*, 1996; LEWIS, 1990). Outras vantagens na utilização desse sistema são: fácil administração; alta estabilidade, uma vez que são liofilizadas e podem ser reconstituídas imediatamente antes da administração; possibilidade de inclusão de diferentes antígenos e/ou adjuvantes em uma única formulação, além da produção de vacinas de dose única (WAECKERLE-MEN and GROETTRUP, 2005).

Estudos realizados pelo nosso grupo utilizando microesferas de PLGA contendo DNA-Hsp65 e o adjuvante DMT (única dose de DNA) mostraram que essa formulação induziu uma resposta imune humoral, com produção de IgG2a e resposta imune celular, com produção de IFN- γ , o que conferiu proteção a camundongos Balb/c contra subsequente desafio com a cepa H37RV de *M.tuberculosis* (LIMA *et al.*, 2003). Esta abordagem, comparada com o DNA-Hsp65 foi mais eficaz, pois reduziu o número de doses administradas e a quantidade de DNA (três doses de 100 μ g) sem, no entanto alterar sua capacidade em induzir uma resposta imune protetora. Resultados similares também foram obtidos por CAI *et al.* 2005. Usando três diferentes vacinas de DNA expressando Ag85B ou MPT-64 ou MPT-83, eles imunizaram camundongos com preparações de microesferas de PLGA em dose única ou com três doses de DNA nu e mostraram que após o desafio com a cepa virulenta H37RV de *M.tuberculosis*, as vacinas encapsuladas em microesferas

mostraram uma proteção similar à observada com o DNA nu, ou seja, uma única dose da vacina encapsulada foi eficaz em proteger animais desafiados da mesma forma que três doses de DNA nu.

1.4.2- Administração de vacinas de DNA utilizando a estratégia de “Prime-Boost”

A estratégia de “prime-boost” heterólogo foi introduzida recentemente e consiste na administração de um mesmo antígeno sob diferentes sistemas de liberação (MCSHANE, 2001). Essa estratégia tem como objetivo induzir uma resposta imune mais eficiente que a induzida por uma vacina de dose única ou com “boost” homólogo. Um aumento da resposta imune para o antígeno alvo tem como reflexo um aumento no número de células T antígeno-específicas, aumentado seletivamente a atividade das células T e com isso a eficácia contra diversos patógenos (WOODLAND 2004). Estudos recentes demonstraram a eficácia dessa estratégia em gerar resposta imune celular para uma variedade de patógenos, incluindo *M. tuberculosis* (MCSHANE *et al.*, 2001; FENG *et al.* 2001), HIV e SIV (TAKEDA *et al.*, 2003; SHIVER *et al.*, 2002). Malária (GILBERT *et al.*, 2002; BRUNA-ROMERO *et al.*, 2001), *Listeria monocytogens* (FENSTERLE *et al.*, 1999), leishmania (GONZALO *et al.*, 2002), Virus Ebola (SULLIVAN *et al.*, 2003), hepatite C (MATSUI *et al.*, 2003), herpes simples Virus (MASEDA *et al.*, 2002), papiloma virus humano (van der BURG *et al.*, 2001) e hepatite B (PANCHOLI *et al.*, 2001).

No caso da TB, essa estratégia é baseada na administração de uma dose de BCG, que já é amplamente administrada, seguida de uma segunda dose de reforço com outra vacina contra TB, diferente do BCG. A segunda dose pode ser uma vacina de subunidade (proteína ou DNA) ou uma vacina atenuada e tem como função estimular resposta imune de forma mais eficaz. Vários são os antígenos testados com esta estratégia. Um candidato promissor é a vacina MVA85 que utiliza como vetor o vírus da vaccinia Ankara recombinante, modificado pela adição do gene que codifica o antígeno 85A (McSHANE,

2003). Teste clínico de fase I com essa vacina mostrou que a mesma pode dar o “reforço” à resposta imune contra TB em indivíduos previamente vacinados com BCG (McSHANE *et al*, 2004). Essa seria uma estratégia muito viável se considerarmos que muitos indivíduos já receberam uma dose do BCG e, portanto, só receberiam uma dose com outra formulação.

Outra vacina que está sendo avaliada é Mtb72F, que é uma proteína obtida da fusão dos antígenos Mtb39 e Mtb32. Essa vacina foi testada como vacina de subunidade (SKEIKY *et al*, 2004) e na estratégia de “prime-boost” como reforço para a vacina de BCG (BRANDT *et al*, 2004) apresentando resultados promissores que a levaram ao estudo clínico de fase I. A Mtb 72F constitui a primeira vacina recombinante contra TB a ser testada em humanos (SKEIKY *et al*, 2004). Desse modo, esse tipo de estratégia é mais eficiente em induzir uma resposta celular específica e pode ser empregada na otimização de vacinas de DNA para TB com o intuito de diminuir a dose e melhorar a resposta desencadeada pelos protocolos de vacinação.

Dados do nosso grupo demonstraram que a estratégia de “prime-boost”, utilizando DNA-Hsp65 em combinação com BCG em diferentes esquemas de vacinação, foi capaz de induzir resposta específica para a Hsp65. Dentre os esquemas empregados, o que demonstrou ser mais imunogênico e protetor, foi a estratégia que empregava “prime” com BCG pela via intranasal e “boost” com DNA-Hsp65 pela via intramuscular, demonstrando que a via de imunização é relevante para a modulação da resposta imune específica (GONÇALVES E.D.C, 2006). Esses resultados determinaram o esquema de “prime-boost” com BCG e DNA-Hsp65 utilizado neste trabalho.

Em adição a essa estratégia, outra proposta do nosso grupo foi o uso das microesferas como sistema de “prime-boost” para a proteção na TB (RUBERTI *et al.*, 2004). Essa construção vacinal utiliza microesferas de PLGA 50:50 (liberação rápida) contendo DNA-Hsp65/DMT (“Priming”) e microesferas de PLGA 75:25 (liberação lenta) contendo a proteína recombinante Hsp65 (“Boost”). Esta estratégia mostrou-se promissora, pois resultou em uma resposta imune mais prolongada, quando comparada com as microesferas contendo apenas DNA-Hsp65/DMT. Além disso, foram detectados, altos níveis de

anticorpos específicos para hsp65 e produção de IFN γ que persistiram por até 90 dias após a imunização. Esse tipo de construção apresenta, maior eficiência no processo de captura pelas APCs e proteção do DNA plasmideal contra a ação de endonucleases, proporcionando uma redução na quantidade de DNA a ser encapsulado e no número de doses que são os principais objetivos desse trabalho.

1.4.3- Vetorização passiva de vacinas de DNA por lipossomas catiônicos

Em 1965, Bangham *et al.* demonstraram, pela primeira vez, que cristais de lecitina formados espontaneamente permitiam uma difusão de íons similar a de membranas biológicas, o que proporcionava a encapsulação de solutos. Essas estruturas que possuíam tais propriedades foram denominadas lipossomas. Na década de 70, sua capacidade de carrear enzimas, drogas anti-tumorais e microbicidas foi descrita (GREGORIADIS, 1976a; GREGORIADIS, 1976b), bem como de potencializar a resposta imune a antígenos encapsulados (ALLISON & GREGORIADIS, 1974).

Os lipossomas são compostos por lipídeos biodegradáveis atóxicos, se organizam em bicamadas de fosfolipídeos e formam vesículas contendo um meio aquoso em seu interior. Essas vesículas podem apresentar uma única (unilamelar) ou várias (multilamelar) bicamadas e, até mesmo, formar agregados lipídicos. Tal construção permite a encapsulação e a veiculação de substâncias tanto hidrofílicas quanto lipofílicas, sendo que a eficiência desse processo depende da metodologia utilizada, do tamanho da vesícula, dos componentes lipídicos e do tipo da substância encapsulada (GREGORIADIS, 1990). Com relação às suas características eletroquímicas, os lipossomas podem ser catiônicos, aniônicos ou neutros. Porém, no que se refere ao uso em vacinas de DNA, a encapsulação dos plasmídeos em lipossomas catiônicos é mais eficiente, já que o DNA possui carga negativa (grupamento fosfato) (ZHDANOV *et al.*, 2002). Uma característica importante para a aplicabilidade dos lipossomas em formulações vacinais é sua propriedade adjuvante. Nos Estados Unidos e Europa esses carreadores já são licenciados para uso clínico, o que torna

mais fácil a aprovação de novas vacinas veiculadas por esse sistema (GREGORIADIS, 1995; GOYAL *et al.*, 2005).

Ao contrário do que ocorre com vacinas de DNA nu, administradas pela via intramuscular, as vacinas de DNA encapsuladas em lipossomas, administradas pela mesma via, protegem o DNA das nucleases e, preferencialmente, são capturadas por APCs, potencializando a resposta imune (GREGORIADIS *et al.*, 2002). As forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas que mantêm o complexo lipossoma-DNA unido também são responsáveis pela entrada do complexo no interior da célula por dois caminhos diferentes: o principal, por endocitose, e o menos usual (apenas 2%), por fusão do complexo à membrana celular e liberação do seu conteúdo diretamente para o citosol. Esses eventos são também denominados de lipofecção e o seu sucesso ocorre quando o plasmídeo escapa da degradação intracelular, alcança o núcleo e inicia a sua expressão gênica (ZHDANOV *et al.*, 2002).

GREGORIADIS *et al.* (1997) demonstraram que o plasmídeo contendo o gene que codifica a região S do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) encapsulado em lipossomas catiônicos, após administração pela via intramuscular, induz uma produção de IgG1 cerca de cem vezes maior, bem como níveis aumentados de IFN- γ e IL-4, quando comparados à vacinação com o DNA nu. Além disso, diversos pesquisadores têm observado o aumento da resposta imune e proteção das vacinas de DNA utilizando lipossomas catiônicos como carreadores, em vários modelos experimentais como na esquistossomose (ZHANG *et al.*, 2000), na influenza (WONG *et al.*, 2001), hepatite B (JOSEPH *et al.*, 2002), hepatite C (JIAO *et al.*, 2003).

WONG *et al.* (2001) avaliaram um protocolo de imunização intranasal e intramuscular, utilizando uma vacina de DNA contra o vírus da influenza, que conferiu proteção, em ambas as vias, à infecção. Neste mesmo trabalho, os autores utilizaram a vacina, em duas formulações: DNA nu e encapsulada em lipossomas catiônicos, observando ganho em eficiência, com aumento de IgA secretada nos animais que receberam a vacina encapsulada. JOSEPH *et al.* (2002), utilizando também as vias de

imunização nasal e muscular para a administração de uma vacina de DNA encapsulada contra os vírus da Hepatite B e Infuenza, descreveram aumento da resposta humoral e do número de células T produtoras de IFN- γ e posterior proteção para ambos os modelos virais. Já no modelo de TB experimental, D'SOUZA *et al.* (2002), utilizando uma vacina de DNA codificando os antígenos Ag85A, Ag85B ou PstS-3 de *M. tuberculosis* encapsulada em lipossomas catiônicos, verificaram que houve indução de resposta imune celular e humoral, sendo essa resposta protetora, nas duas vias de imunização (intramuscular e intranasal). Diante desses resultados, a administração de formulações com lipossomas por via de mucosa nos parece promissora para a veiculação de DNA-Hsp65 nessa abordagem para vacinas contra TB, uma vez que por essa rota a vacina pode induzir imunidade de mucosas, a primeira linha de defesa que é importante para infecções respiratórias como a TB.

Estudos do nosso grupo demonstraram que a vacinação por via intravenosa, com a proteína recombinante Hsp65 de *M. leprae*, utilizando lipossomas como carreadores, foi capaz de estimular resposta imune protetora de padrão Th1 em camundongos posteriormente infectados com *M. tuberculosis* (LIMA *et al.*, 2001). Entretanto, esta resposta foi de curta duração, o que pode ser explicado pelo fato de ter sido utilizado um adjuvante inadequado, pois foi utilizado um lipossoma catiônico comercial que geralmente tem um potencial de transfecção, menor quando comparado com as construções lipossomais desenvolvidas recentemente (ZHDANOV *et al.*, 2002). Assim, os lipídeos catiônicos nos últimos anos são utilizados como estratégia de vacinação e terapia gênica (FELGNER *et al.*, 1994; REMY *et al.*, 1994; GAO & HUANG, 1995; BALASUBRAMANIAN *et al.*, 1996; BUDKER *et al.*, 1996; ROSENZWEIG *et al.*, 2000 e 2001).

Mais recentemente, nosso grupo produziu uma construção lipossomal baseada na formulação proposta por PERRIE & GREGORIADIS (2000) contendo a vacina de DNA-Hsp65. Nessa construção, agregados lipídicos e o DNA plasmideal foram associados formando a estrutura de lipossomas multilamelares com o DNA na superfície (DRV-DNA; do inglês "Dehydrated-Rehydrated Vesicles"). Esse tipo de construção apresentou diferente cinética de liberação do DNA plasmideal, maior eficiência no processo de captura pelas

APCs e proteção do DNA plasmideal contra a ação de endonucleases, proporcionando uma redução na quantidade de DNA a ser encapsulado e até mesmo no número de doses. Além do mais, quando administrado pela via intranasal conferia proteção em animais infectados com *M.tuberculosis*, mas o mesmo resultado não foi observado quando a via de imunização foi a intramuscular (ROSADA, S.R, 2006). Esses resultados demonstram que dependendo do modo como a vacina de DNA é oferecida ao sistema imune, pode desencadear diferentes padrões de resposta imune, levando ou não a proteção. Potanto a via intranasal é promissora para o desenvolvimento de vacinas para TB, por ativar a resposta imune de mucosas que está associada com grande produção de IFN- γ e IL-12 citocinas importantes na defesa do organismo contra o bacilo. (HOFT *et al*, 2005). Partindo desses resultados foi determinada a via de imunização para a formulação de liposomas, utilizada para o nosso trabalho.

Diante do exposto, o presente estudo propôs estudar diferentes estratégias vacinais contendo o plasmídeo DNA-Hsp65 com o intuito de reduzir a dose do antígeno, simplificar o calendário de imunizações e obter uma forma mais eficiente de administração desse antígeno e como consequência aumentar a proteção induzida pela vacina.

2-HIPÓTESE

A utilização de sistemas de liberação controlada e estratégias de imunização heteróloga permitirão a otimização da vacina de DNA-Hsp65 através da redução da quantidade de DNA e diminuição no número de imunizações.

3- OBJETIVO GERAL

O presente trabalho propõe a otimização da vacina de DNA-Hsp65 em dose única, simplificando o esquema de vacinação e a redução da quantidade de DNA a ser administrado, utilizando diferentes sistemas de liberação controlada e a estratégia de “prime-boost” para imunização.

3.1- Objetivos Específicos

1- Avaliar a eficácia da vacina DNA-Hsp65 utilizando dois sistemas de liberação controlada (microesferas e lipossomas) e uma estratégia de “prime-boost” (BCG como “prime” e DNA como “boost”).

2- Determinar qual das formulações/estratégias utilizadas é a mais eficaz e segura para otimização da vacina de DNA-Hsp65.

4-MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Vacina de DNA-Hsp65

A vacina de DNA-Hsp65 utiliza um inserto de 3000 pares de bases, que codifica a proteína de choque térmico (Hsp) de 65 kilodaltons de *M. leprae*, subclonado no sítio Bam HI e Not I do vetor pVAX1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A subclonagem foi gentilmente realizada pela Profa. Dra. Sylvia Cardoso Leão da UNIFESP.

4.1.1- Obtenção do plasmídeo

O plasmídeo pVAX-Hsp65 foi purificado por cromatografia de troca iônica, utilizando-se Endofree Plasmid Giga Kit™ (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA). Para a realização desse protocolo, uma colônia de bactérias *Escherichia coli* DH5α™ transformada com o plasmídeo recombinante pVAX-Hsp65 foi retirada de uma placa recém preparada contendo meio LB Agar (SIGMA, Germany) e kanamicina (Cilinson™) na concentração de 50 µg/mL. Esta colônia foi inoculada em 5,0 mL de caldo “broth base” (LB) (GIBCO BRL, Scotland) com kanamicina (50 µg/mL) e incubada durante 8 horas a 37°C sob agitação vigorosa (250 rpm) em incubadora de agitação (Incubator shaker series 25, New Brunswick, Edison, New Jersey, USA). A cultura inicial foi diluída 1/500 em 2,5 litros de caldo broth base (LB), contendo kanamicina (50 µg/mL), e incubada a 37°C sob agitação (250 rpm) por 16 horas adicionais. Após incubação, o material foi centrifugado a 5500 rpm 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 foi adicionado 125 mL de tampão P2 (NaOH 200 mM; SDS 1%) para lise alcalina e, após 5 minutos, foi adicionado 125 mL do tampão P3 (acetato de potássio 3,0 M pH 5,5). O material foi filtrado, adicionado ao tampão ER (para remoção do LPS – composição não revelada pelo fabricante) e mantido no gelo por 30 minutos. O filtrado foi aplicado à resina da QIAGEN™ 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 100 mL de tampão QN (NaCl 1,25 M; MOPS 50 mM pH 7,0; etanol 15 %). O DNA eluído foi precipitado em 70 mL de isopropanol e, em seguida, centrifugado a 14000 rpm por 45 minutos a 4°C e o sedimento ressuspendido em 0,5 - 1,0 mL de água. A quantificação do plasmídeo pVAX-hsp65 foi realizada por espectrofotometria no aparelho GeneQuant II™ (Amersham-Pharmacia, BioSciences, USA), nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

4.1.2- Avaliação da integridade do plasmídeo

Como o plasmídeo pVAX-1 e o inserto Hsp65 têm tamanhos semelhante (≈3000 pb) foi utilizada a enzima de restrição *BamH* I (Invitrogen), que nesse caso, digere o plasmídeo pVAX-Hsp65 em apenas um único sítio de restrição, não removendo o inserto (Hsp65). Isso lineariza o plasmídeo, o que permite a confirmação da amostra que possui o plasmídeo pVAX-Hsp65 (≈6000 pb). Para tanto, 1µg do plasmídeo foi incubado com *BamH* I (1 unidade/µg de DNA) a 37°C por 3 horas. Em seguida os produtos da digestão de cada amostra, e também o plasmídeo não digerido, foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (GIBCO BRL) a 1%. No preparo deste gel, as amostras foram ressuspensas em tampão de eletroforese 6 vezes concentrado (0,25 % azul de bromofenol; 40 % de sucrose em água) e o material submetido à eletroforese em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM pH 8,3). A corrida foi realizada a 76 V por 1 hora utilizando o aparelho da Life Technologies Inc., Modelo 250 (BRL). O padrão de 1Kb Plus DNA Ladder (GIBCO BRL, Scotland) foi utilizado como marcador de peso molecular. O gel foi corado com 0,5 µg/mL de brometo de etídio (Gibco BRL) e a visualização das bandas foi feita em luz ultravioleta no ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech).

4.2- Obtenção da Hsp65 recombinante (rHsp65)

Para a realização desse protocolo, uma colônia de bactérias *Escherichia coli* ER2566 transformadas com o plasmídeo pET28 contendo o gene da Hsp65, foi retirada de uma placa recém preparada contendo meio LB Agar (SIGMA, Germany) e kanamicina (CilinsonTM) na concentração de 50 µg/mL. Esta colônia foi inoculada em 10 mL de caldo “broth base” (LB) (GIBCO BRL, Scotland) com kanamicina (30 µg/mL) e incubada durante 8 horas a 37°C sob agitação vigorosa (250 rpm) em incubadora de agitação (Incubator shaker series 25, New Brunswick, Edison, New Jersey, USA). A cultura inicial foi diluída 5 vezes para volume final de 40 mL de meio LB BROTH BASE (Gibco BRL, Scotland) contendo kanamicina na concentração de 30 µg/mL a 37°C sob agitação de 250 rpm por 4 horas. Esse pré-Inóculo foi diluído 50 vezes para um volume final de 2,5 L de LB/Kanamicina e incubado por 3-4 horas até atingir a D.O_{600nm} = 0,6 nm. A expressão da proteína foi induzida com IPTG (Isopropylthio-D-Galactoside, Gibco BRL) a 300mM a uma temperatura de 30°C sob forte agitação (250rpm) overnight. Após incubação, as células foram coletadas por centrifugação a 5000 x g por 15 minutos em centrífuga J2HS (Beckman, rotor JS-7.5), ressuspensas em 20 mL de tampão fosfato e lisadas por ultrassom. Após centrifugação a 14.000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 30 mL de tampão fosfato contendo Uréia 5M e agitado por 1 hora. A suspensão foi então centrifugada a 14.000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante coletado e submetido à cromatografia de afinidade utilizando-se a coluna HiTrapTM Chelating HP (GE Healthcare), conforme o protocolo especificado pelo fornecedor. A amostra de proteína foi eluída da coluna por concentrações crescentes de imidazol. Após a eluição a proteína foi dializada contra PBS 1X. Para a quantificação da Hsp65 recombinante utilizou-se Coomassie® Protein Assay Reagent (Pierce) e para a quantificação de endotoxinas o teste de LAL (*Limulus ameobocyte* Lysate) (Kit QCL- 1000 – Quantitative Cromogenie – Bio Whittaker – CAMBREX Company).

4.2.1- Dosagem e Caracterização da Proteína

A dosagem da proteína foi feita por espectrofotometria utilizando-se o reagente Coomassie para ensaios com proteínas (Pierce, Rockford, Illinois USA). A leitura foi realizada em $\lambda = 600$ nm em leitor de ELISA Σ 960 (Meterch).

4.3- Microesferas de DNA-Hsp65: Encapsulamento e Caracterização

4.3.1- Encapsulamento do plasmídeo pVAX-Hsp65 juntamente com DMT em microesferas poliméricas biodegradáveis

As microesferas de PLGA [50:50 Poli (D,L-lático-co-glicólico)] foram obtidas pelo método da emulsão múltipla e evaporação do solvente. Para isso, a fase aquosa contendo pVAX-Hsp65 foi emulsionada, sob forte agitação (11000 rpm) por 1 minuto, em uma solução de cloreto de metileno (JT Baker, United States) contendo PLGA 50:50 (PURAC, Netherlands) e DMT (1 mg/mL; Sigma-Aldrich – USA), utilizando o homogenizador Ultraturrax Heidolph Diax 900 (Heidolph, Germany) para obtenção de uma emulsão primária água/óleo (A/O). Esta emulsão foi vertida na fase aquosa externa contendo 3% de álcool polivinílico (Mowiol 8/88, Clariant) como tensoativo. A mistura foi homogeneizada por 1 minuto (11000 rpm) para formação da emulsão água/óleo/água (A/O/A). O solvente orgânico foi eliminado por evaporação à temperatura ambiente sob agitação (500 rpm) com o auxílio do agitador mecânico Heidolph RZ 2021 (Heidolph, Germany) por 6 horas. As microesferas foram coletadas por centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos a 4° C em centrífuga Medifriger BL-S (P-Selecta, Spain), lavadas 3 vezes com água Milli-Q estéril, liofilizadas por 12 horas e armazenadas a 4° C. Todo este procedimento foi realizado de forma asséptica, em sala limpa, cabine de fluxo laminar e utilizando material estéril e livre de endotoxinas.

4.3.2- Avaliação da eficiência do encapsulamento (“load”) do plasmídeo pVAX-Hsp65

A taxa de encapsulamento do plasmídeo foi determinada conforme descrito por DIWAN e PARK (2001). Aproximadamente 10 mg de microesferas foram pesados e ressuspensos em 1 mL de acetonitrila (JT Baker, United States). Após agitação em vortex (Ika, Germany) por 1 minuto, o material foi centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao resíduo foram adicionados 500 µL de NaOH 0,1M. Novamente o material foi submetido a agitação em vortex por 1 minuto e centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo (sobrenadante fase alcalina). Adicionou-se 500 µL de PBS pH=7,4, agitou-se em vortex por 1 minuto e centrifugou-se a 14000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo (sobrenadante fase aquosa). Por fim, alíquotas de sobrenadante da fase alcalina e aquosa foram dosados em Gene Quant II (Pharmacia Biotech). A taxa de encapsulação foi calculada como sendo a soma de ambas.

4.4- Microesferas de proteína recombinante hsp65: Encapsulamento Caracterização

4.4.1- Encapsulamento da proteína Hsp65 recombinante em microesferas poliméricas biodegradáveis

As microesferas de PLGA [85:15 Poli (D,L-lático-co-glicólico)] foram obtidas pelo método da emulsão múltipla e evaporação do solvente. A proteína Hsp65 recombinante foi obtida previamente pelo nosso grupo conforme metodologia descrita (Sandra Aparecida dos Santos, Tese de Doutorado, 2006). Para o preparo das formulações, a fase aquosa contendo a proteína recombinante Hsp65 foi emulsionada, sob forte agitação (11000 rpm) por 1 minuto, em uma solução de cloreto de metileno (JT Baker, United States) contendo PLGA 85:15 (PURAC, Netherlands), utilizando o homogenizador Ultraturrax Heidolph Diax 900 (Heidolph, Germany) para obtenção de uma emulsão primária água/óleo (A/O). Esta

emulsão foi vertida na fase aquosa externa contendo 3% de álcool polivinílico (Mowiol 8/88, Clariant) como tensoativo. A mistura foi homogeneizada por 1 minuto (11000 rpm) para formação da emulsão água/óleo/água (A/O/A). O solvente orgânico foi eliminado por evaporação à temperatura ambiente sob agitação (500 rpm) com o auxílio do agitador mecânico Heidolph RZ 2021 (Heidolph, Germany) por 6 horas. As microesferas foram coletadas por centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos a 4º C em centrífuga Medifriger BL-S (P-Selecta, Spain), lavadas 3 vezes com água Milli-Q estéril, liofilizadas por 12 horas e armazenadas a 4º C. Todo este procedimento foi realizado de forma asséptica, em sala limpa, cabine de fluxo laminar e utilizando material estéril e livre de endotoxinas.

4.4.2- Avaliação da eficiência do encapsulamento (“load”) da proteína Hsp65 recombinante

A taxa de encapsulamento dos plasmídeos foi avaliada como descrito no item 4.3.2. Por fim, alíquotas e respectivas diluições de sobrenadante da fase alcalina e aquosa foram dosadas, utilizando Coomassie Blue Reagent (Pierce, United States). Em placa de 96 poços, foram adicionados 50 µL de amostra, diluição e curva padrão e 200 µL de Coomassie Blue Reagent. Realizou-se a leitura a 600 nm em espectrofotômetro µQuant (Biotek Instruments, United States). A taxa de encapsulação foi calculada como sendo a soma de ambas.

4.5- Determinação do diâmetro das Microesferas

O diâmetro das partículas foi determinado por difratometria a laser utilizando o equipamento LS230 - Small Volume Module Plus (Coulter, United States). Os resultados foram apresentados na forma de tabela.

4.6- Obtenção de construções lipossomais com DNA-HSP65

No trabalho foi utilizado uma construção lipossomal constituída de agregados lipídicos para a veiculação do plasmídeo pVAX-Hsp65. A produção criteriosa e a caracterização físico-química dessas construções lipossomais foram feitas pela doutoranda Lucimara Gaziola de la Torre (Processo FAPESP n.º 02/03224-2) da UNICAMP. A composição e metodologia de preparação das estruturas foram baseadas nos estudos de PERRIE & GREGORIADIS (2000) e PERRIE *et al.* (2001), com modificações introduzidas a partir do desenvolvimento do trabalho de doutorado acima citado. As modificações visaram principalmente a diminuição da dose de 400 µg do DNA plasmideal para atender à dose pretendida de 25µg e a obtenção de lipossomas com diâmetro médio menor que 3000 nm. Nos lipossomas, o plasmídeo foi encapsulado, ou seja, complexado às bicamadas da superfície externa, DRV-DNA. Nessa sigla, o prefixo DRV refere-se a vesículas preparadas pelo método da desidratação–rehidratação, de acordo com PERRIE & GREGORIADIS (2000) e a composição do DRV-DNA-Hsp65 é a seguinte: Lipossoma multilamelar complexado ao vetor plasmideal pVAX1 subclonado com gene da Hsp65 de *M. leprae*.

4.7- Teste para detecção de endotoxinas

Todas as amostras vacinais contidas nas diferentes formulações e proteínas utilizadas no trabalho foram submetidas ao teste cromogênico do lisado de amebócito de *Limulus polyphemus* (Kit QCL- 1000 – Quantitative Cromogenie – Bio Whittaker – CAMBREX Company), para avaliação do nível de endotoxinas presente. As amostras e os padrões utilizados na construção da curva de calibração foram incubados em uma placa de 96 poços com o LAL, fornecido pelo kit, a 37°C por 10 minutos. O substrato fornecido pelo kit foi misturado com a amostra-LAL e incubado por 6 minutos a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de ácido acético a 25%. A absorbância da amostra foi determinada com filtro 405-410 nm em espectrofotômetro µQuant Bio-Tek Instruments Inc.

4.8- Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c, SPF (do inglês “Specific Pathogen Free”), fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade, provenientes do Biotério de Animais Isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Os animais infectados com *M. tuberculosis* foram mantidos em isoladores de animais, em laboratório de nível III de biossegurança, com temperatura, umidade, fluxo de ar e ciclo de luz claro/escuro controlados, com livre acesso à água e ração.

4.9- Imunizações

Camundongos BALB/c (n=10) receberam diferentes formulações vacinais individuais com as seguintes descrições: Para imunização com DNA-Hsp65, o plasmídeo pVAX-Hsp65 foi administrado em solução de sacarose (25%) por injeção intramuscular de 100 µg de DNA em 100 µL. As imunizações foram administradas com 50 µL da solução em cada músculo quadríceps em intervalos quinzenais, totalizando 4 doses (400 µg de DNA). Para imunização com os lipossomas: uma dose de lipossomas contendo 25 µg de pVAX-Hsp65 foi administrado pela via intranasal. Para imunização com microesferas: uma dose contendo microesferas de pVAX-Hsp65 (30µg) juntamente com microesferas de rHsp65 (1,7 µg) em 100 µL de salina pela via intramuscular. Para imunizações em esquema de “Prime-Boost”: Uma dose de BCG-*Moreau* (1×10^5 UFC) em diluente pela via i.n e após 15 dias uma dose de pVAX-Hsp65 (100 µg) pela via i.m. Para imunização do grupo BCG foi utilizada 1×10^5 UFC de BCG-*Moreau* em salina pela via subcutânea. Como controle, os animais foram imunizados apenas com salina 0,9%. Para os experimentos de proteção, 15 dias após a última imunização, os animais foram desafiados com (1×10^4 UFC) da cepa H37Rv de *M. tuberculosis* pela via intratraqueal (i.t). Trinta dias após o desafio, os animais foram mortos.

4.10- Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem de anticorpos

A resposta imune humoral foi avaliada através da produção de anticorpos específicos anti-Hsp65 (IgG1 e IgG2a), por ELISA nas amostras de soro pré-ímmunes e soros coletados duas semanas após a última imunização, através do plexo-retro orbital. Placas de 96 poços de poliestireno (Maxisorp Nunc-Immuno Plates, Rochester, NY, USA) foram sensibilizadas com 100 µL da solução de proteína Hsp65 diluída em tampão de ligação (Na_2HPO_4 0,1 M pH 9,0) numa concentração final de 5 µg/mL. As placas foram incubadas a 4°C durante uma noite e posteriormente lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 e bloqueadas com 200 µL/poço de PBS contendo 0,05% de Tween 20. Após incubação por 1 hora, a 37°C, as placas foram novamente lavadas e adicionou-se 100 µL/poço dos soros, diluídos 1:50, 1:100 e 1:1000, em PBS/Tween 20 (0,05%). As placas foram incubadas por 2 horas a 37°C, e após lavagem das mesmas, foi realizada incubação por 1 hora, a 37°C, com anticorpo monoclonal anti-IgG1 ou anti-IgG2a conjugados com biotina diluídos 1000 vezes (PharMingen, San Diego, CA, USA), adicionando-se 100 µL/poço do anticorpo diluído em solução de PBS/Tween 20 (0,05%) numa concentração final de 0,5 µg/mL. Após procedimento de lavagem, foi adicionada 100 µL/poço da solução de avidina biotina peroxidase StrepAB kit™ diluídas 1000 vezes (Dako, Carpinteria, CA, USA) sendo incubada por 30 minutos a temperatura ambiente (TA). As placas foram reveladas pela adição do OPD (o-Phenylenediamine-Dihydrochloride) em tampão contendo H_2O_2 e a reação foi interrompida pela adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico 16%. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de placa (µQuant Bio-Tek Instruments Inc.) em 490nm. Todos os anticorpos utilizados foram adquiridos da PharMingen e utilizados de acordo com as instruções do fabricante.

4.11- Preparo do inóculo de *M. tuberculosis*

A suspensão de *M. tuberculosis* da cepa H37Rv (ATCC 27294), foi obtida a partir de uma alíquota congelada a -70° C, na qual foi verificada viabilidade superior a 85% (incubação de uma amostra com diacetato de fluoresceína e brometo de etídio) (McDonough & Kress, 1995). 50 µL da alíquota foram semeados em meio Lowenstein-Jensen (DIFCO) 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, sendo incubada por 7 a 10 dias, a 37° C. A viabilidade foi novamente verificada com auxílio de microscópio de fluorescência (Leica), onde as bactérias viáveis apresentam coloração verde enquanto que as bactérias mortas coram-se com a solução de brometo, apresentando-se com uma coloração avermelhada. O número de bacilos da suspensão foi determinado segundo padronização da curva de crescimento da micobactéria relacionando-se a fase logarítmica do microrganismo e unidades formadoras de colônias. A suspensão de micobactérias foi avaliada na densidade óptica de 540 nm e, a partir do valor obtido, o número de bacilos da suspensão foi então calculado pela equação da reta determinada pela curva de crescimento (KAUFMANN & KABELITZ). A suspensão foi centrifugada a 3500 rpm por 20 minutos, o sedimento foi ressuspenso em 1 mL de salina estéril e agitado vigorosamente em tubo cônico com pérolas de vidro estéreis por 2 minutos. Acertou-se a concentração de bacilos (1×10^5 bacilos/mL) presentes no volume de cultura centrifugado por diluição com salina. Todos os procedimentos de cultura da micobactéria, preparo do inóculo e desafio dos animais foram realizados em laboratório de nível de biossegurança III.

4.12- Desafio dos animais com *M. tuberculosis*

Cada animal foi desafiado com 100 µL de suspensão contendo 1×10^4 bacilos de *M. tuberculosis* H37Rv por via intratraqueal, 30 dias após a última imunização. Para esse procedimento, os animais foram previamente anestesiados com uma solução de tribromoetanol (ACROS ORGANICS) a 2,5% em PBS por via intraperitoneal. Após a

anestesia, realizou-se o procedimento cirúrgico para exposição da traquéia dos animais e inoculação dos bacilos.

4.13- Avaliação do pulmão dos animais infectados

Trinta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e os pulmões coletados e colocados em placas de Petri estéreis contendo 2 mL de meio RPMI-1640 Incompleto. Os pulmões foram pesados e tiveram seus lóbulos separados para os diversos procedimentos experimentais: o lóbulo superior direito foi colocado em um tubo contendo 10 mL de formol tamponado para posterior processamento e análise histológica; os lóbulos esquerdos foram coletados em tubos contendo 2mL de meio RPMI-1640 incompleto e armazenados a -20°C para posterior detecção de citocinas; os lóbulos médio e inferior direitos foram coletados em placas de petri de 22 mm de diâmetro (Corning) para obtenção de células para a realização de (“enzyme-linked immunospot assay”) Elispot e determinação do número de UFC.

4.13.1- Coleta, digestão e obtenção das células do pulmão.

A obtenção das células do pulmão foi realizada de acordo com protocolo descrito por BONATO *et al* (2004). Os lóbulos médio e inferior esquerdos, destinados a UFC, Elispot, foram pesados e cortados em pequenos fragmentos e transferidos para um tubo cônico (Falcon) de 50 mL contendo 15 mL da solução de digestão. Essa solução foi preparada em meio de cultura RPMI-1640 incompleto contendo 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de Liberase (Liberase Blendzyme – Roche, Indianapolis, IN) e 25 U/mL de Desoxiribonuclease I (GIBCO BRL). Após a adição da solução de digestão, os tubos foram incubados a 37°C , sob agitação constante, durante 30 minutos. Após a digestão, as células foram dispersas com auxílio de uma seringa de 10 mL e centrifugadas a 1500 rpm, por 10 minutos, a 4°C . O sedimento foi ressuspenso em 1mL de RPMI-1640 incompleto. Uma alíquota de 100 μL dessa suspensão foi retirada para o protocolo de UFC e o restante foi novamente centrifugado e o sedimento ressuspenso em 5 mL de meio RPMI-1640 contendo 10% de SFB para inibir atividade da enzima liberase. As células presentes foram separadas do restante da matriz digerida

utilizando-se uma malha de aço inox (Nylex screen –Sigma), após a passagem da suspensão, realizou-se a lavagem da malha com mais 10 mL de meio RPMI-1640. As células obtidas foram centrifugadas a 1500 rpm, por 10 minutos, a 4°C, ressuspensas em 1 mL de meio RPMI-1640 e contadas em câmara de Neubauer. A concentração final foi acertada para 2×10^6 células/mL. Essas células foram utilizadas para o ensaio de Elispot.

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

A partir da alíquota de 100 µL do pulmão digerido foram feitas diluições em PBS de 10, 100, 1000 e 10000 vezes. As diluições (100 µL) foram plaqueadas em meio sólido 7H11, 7H9 (DIFCO Laboratories, Detroit, MI, USA) acrescido de ágar bacteriológico (Difco), adicionando-se 2 gotas de 50 µL em lados opostos da placa. As placas foram vedadas e incubadas a 37°C por 28 dias. Após o período de incubação, as colônias de micobactérias foram contadas com auxílio de lupa (Leica Microsystems, ZOOM 2000). O número de colônias foi corrigido de acordo com as diluições e o peso dos pulmões e expresso em Log_{10} do número de UFC por pulmão.

4.13.4- Ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de citocinas

A detecção de citocinas por ELISA foi realizada no homogenato do pulmão, dos animais imunizados e desafiados. Para a detecção das citocinas presentes no pulmão dos animais, foram coletados os lóbulos superior e inferior esquerdos e colocados em um tubo contendo 2 mL de meio RPMI-1640 incompleto, pesados e armazenados a –20°C. Os lóbulos foram descongelados e homogeneizados com auxílio de homogeneizador mecânico, modelo Ultra-Turrax T8 (IKA-WERKE), centrifugados a 1500 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a –70°C para posterior detecção de citocinas por ELISA (Enzyme –Linked Immunosorbent Assay). A presença de citocinas no homogenato do pulmão foi avaliada quanto à produção de IFN- γ , IL-12, e IL-10. Para a realização do

protocolo de ELISA placas de 96 poços de poliestireno (Maxisorp Nunc-Immuno Plates, Rochester, NY, USA) foram sensibilizadas com 100µL da solução de anticorpo monoclonal purificado específico para a citocina de interesse (PharMingen, San Diego, CA, USA - citados na tabela abaixo), diluído em tampão de ligação (Na_2HPO_4 0,1M pH 9,0) numa concentração final de 1µg/mL. As placas foram incubadas à 4°C, durante uma noite. Após sucessivas lavagens com solução PBS contendo 0,05% de Tween 20 (Vetec) as placas foram incubadas com 200µL/poço da solução de bloqueio, constituída de PBS contendo 10% de soro bovino fetal, durante 1 hora, à temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e as amostras foram adicionadas, 100 µL/poço juntamente com a curva padrão de citocina recombinante, diluída em PBS/SFB 10% Tween 0,05%, e incubadas por uma noite, a 4°C. Após lavagem, foi feita incubação por 1 hora, a temperatura ambiente, com anticorpo monoclonal conjugado com biotina específico para a citocina de interesse (PharMingen, San Diego, CA, USA), adicionando-se 100 µL/poço do anticorpo diluído em PBS / SFB 10% / Tween 20 0,05% numa concentração final de 0,5mg/mL. Após lavagem, adicionou-se 100 µL/poço de solução de avidina biotina peroxidase StrepAB kit™ (Dako, Carpinteria, CA, USA) sendo incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. As placas foram reveladas pela adição do OPD em tampão contendo H_2O_2 e a reação foi interrompida pela adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico 16% (Sigma) após novo procedimento de lavagem. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico 16% (Merck). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de placa (mQuant Bio-Tek Instruments Inc.) em 490 nm. A determinação das concentrações das citocinas foi feita por interpolação dos resultados de absorbância obtidos nas amostras em relação aos da curva padrão. Todos os anticorpos e citocinas recombinantes foram adquiridos da PharMingen e utilizados de acordo com as instruções do fabricante.

Tabela 1. Anticorpos utilizados nos ensaios de ELISA

	Anticorpo Purificado	Anticorpo Biotinilado
IFN- γ	Clone: R4-6A2 Isotipo: IgG1 de rato	Clone: XGM1.2 Isotipo: IgG1 de rato
IL-10	Clone: JES5-2A5 Isotipo: IgG1 de rato	Clone: SXC-1 Isotipo: IgM de rato
IL-12/ p70	Clone: 9A5 Isotipo: IgG2b de rato	Clone: C17.8 Isotipo: IgG2a de rato

4.13.5- Ensaio de ELISPOT para dosagem de citocinas

As células obtidas após a digestão do pulmão foram contadas e acertadas para uma concentração de 2×10^6 células por mL de meio RPMI-1640 completo (Sigma) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (GIBCO; Grand Island, NY, USA), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (10 mg/mL), gentamicina 100 μ g/mL (GIBCO; Grand Island, NY) e 2-Mercaptoetanol ($5 \cdot 10^{-5}$ M, Sigma). As células foram adicionadas à placa de 96 poços que estava previamente sensibilizada com o anticorpo de captura (BD Biosciences) diluído em solução diluente (PBS endo-free /estéril). Posteriormente foram adicionados estímulos específicos 20 μ g de rHsp65 e 20 μ g de Con-A e as células foram incubadas por 48 horas em estufa de CO₂ a temperatura de 37°C. Após o tempo de incubação as placas foram lavadas com água deionizada e incubadas com 100 μ L/poço do anticorpo biotinilado (BD Biosciences) diluído em tampão de diluição, constituído de PBS contendo 10% de soro bovino fetal, durante 2 horas, à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação as placas foram lavadas com solução de lavagem contendo PBS acrescido de 0,05% de Tween 20 (Vetec) e foi adicionada a enzima conjugada (Streptavidina-HRP) (BD Biosciences) diluída em tampão de diluição e as placas incubadas novamente por 1 hora a temperatura ambiente. Após a incubação as placas foram lavadas novamente com solução de lavagem e

foi adicionado 100µl de solução final de detecção (BD™ AEC reagente+ BD™ solução substrato), com incubação por 30 minutos a temperatura ambiente. Por fim as placas foram lavadas com água para parar a reação e a leitura avaliada automaticamente por Bioreader ®-3000 Biosys utilizando o programa ImmunoSpot®.

4.14- Análise histológica do pulmão

Para a análise histológica do pulmão dos animais desafiados, imunizados ou não, o lóbulo superior direito do pulmão de cada animal foi coletado e fixado em formol tamponado 10%. Posteriormente, esse material foi processado pela técnica Elaine Medeiros Floriano, no laboratório coordenado pela Profa. Dra. Simone Gusmão Ramos, no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Foram realizados os cortes histológicos (5 µm) e as lâminas obtidas foram coradas com Hematoxilina e Eosina. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica pela patologista Dr^a Simone Gusmão Ramos.

4.15- Análise morfométrica no tecido pulmonar

A quantificação do infiltrado inflamatório no tecido pulmonar de animais imunizados com as diferentes estratégias vacinais, e posteriormente desafiados, foi realizada em microscópio óptico com um aumento óptico original de 400x, utilizando uma lente ocular com graticulo, conforme ilustrado na figura 1. Os valores do grupo não infectado foram descontados dos demais grupos.

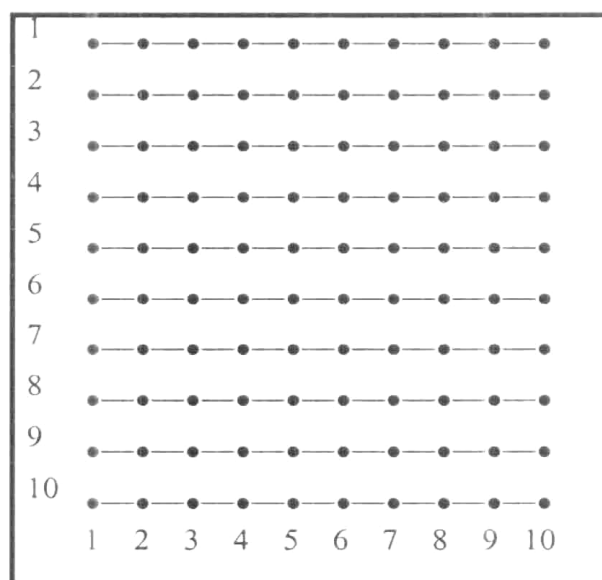


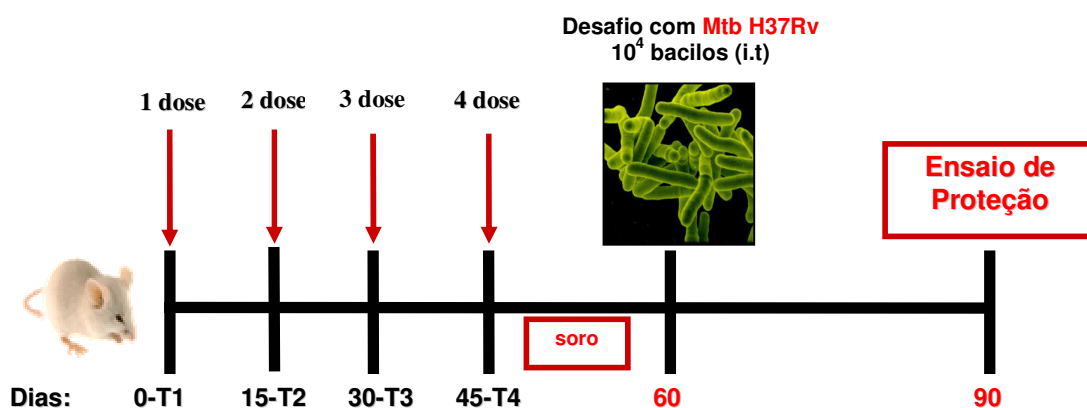
Figura 1. Esquema do Graticulo. Graticulo possui 100 pontos e correspondente a 0,06 mm² de área do por campo pulmão, foi acoplado a ocular do microscópio. As lâminas foram avaliadas com aumento original de 400x. Foram analisados 10 campos totalizando 0,6 mm² de área pulmonar.

4.16- Análise estatística

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

4.16- Delineamento Experimental

Os animais foram imunizados com as diferentes formulações segundo o esquema descrito:



Grupos Experimentais

Grupos	Estratégias Vacinais	Tempos	Vias de imunização
Salina	4 doses de salina sem infecção	_ T1, T2, T3, T4	Intramuscular
N.Im NI (não infectado)	-	-	-
Infectado	4 Doses de salina	T1, T2, T3, T4	Intramuscular
BCG	1 Dose de BCG <i>Moreau</i>	T3	Subcutânea
DNA-Hsp65	4 Doses de DNA-Hsp65	T1, T2, T3, T4	Intramuscular
Microesfera	Uma dose com mistura de microesfera de PLGA de liberação rápida (DNA-Hsp65) e de liberação lenta (proteína Hsp65) .	T3	Intramuscular
“Prime-Boost”	1 ^a Dose de BCG e 2 ^a dose de DNA-Hsp65	T3, T4	Intranasal/ Intramuscular
Lipossoma	1 Dose de DNA-Hsp65 encapsulado em lipossoma	T3	Intranasal

5- RESULTADOS

5.1- Obtenção e caracterização do plasmídeo pVAX-Hsp65

O plasmídeo pVAX-Hsp65, obtido através do kit comercial Endofree e Plasmid Giga Kit™ (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) (item 4.1.1), foi utilizado como componente vacinal nas diferentes estratégias de imunização, propostas nesse trabalho. Antes de iniciar os experimentos, a integridade do plasmídeo foi avaliada com a utilização da enzima de restrição *BamH* I. A análise por eletroforese em gel de agarose 1%, mostrou que a digestão do pVAX-Hsp65 produziu uma banda de 6,0 kb, representando a linearização do vetor e do inserto da Hsp65, ambos de 3,0 kb como era esperado.

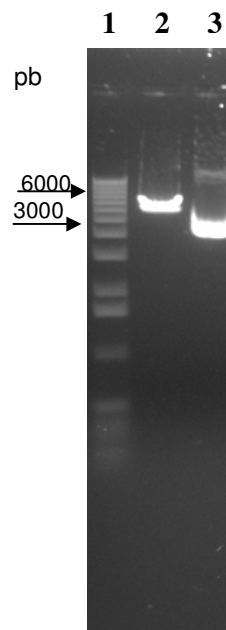


Figura 2. Perfil eletroforético do plasmídeo pVAX-Hsp65. A eletroforese foi realizada em gel de Agarose 1% corado com brometo de etídio para visualização das bandas. Canaleta 1: 1kb DNA ladder (Invitrogen); Canaleta 2: pVAX-Hsp65 digerido com *BamH* I; Canaleta 3: pVAX-Hsp65 não digerido. pb: pares de bases.

5.2- Obtenção e caracterização da Hsp65 recombinante (rHsp65)

A proteína Hsp65 recombinante (rHsp65) foi obtida segundo protocolo de purificação descrito no item 4.2 e foi utilizada nas formulações de microesferas de PLGA de liberação lenta. Para avaliar a pureza da proteína utilizada na formulação, foi feito gel de poliacrilamida SDS/PAGE 10%, onde observamos banda única cujo perfil eletroforético corresponde à proteína hsp65, livre de contaminantes.

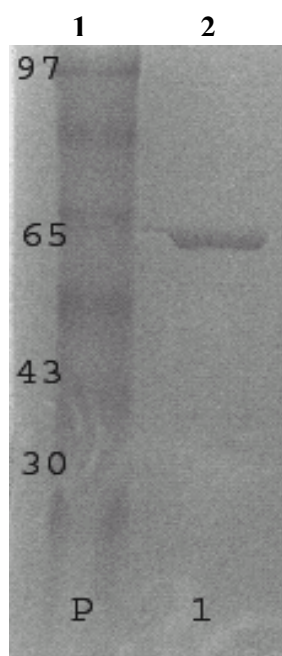


Figura 3. Perfil eletroforético da proteína recombinante Hsp65 purificada. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% corado por Comassie Blue (Pierce, Rockford, Illinois USA) para visualização das bandas. Canaleta 1: Padrão de peso molecular Bench Mark™ Pré stained (protein ladder) Invitrogen; Canaleta 2: Proteína recombinante Hsp65 Purificada por cromatografia de afinidade e o material adsorvido à coluna eluído com 300 μ M de Imidazol.

5.3- Preparo e caracterização das microesferas poliméricas biodegradáveis contendo o plasmídeo pVAX-Hsp65 juntamente com DMT e microesferas de PLGA contendo proteína recombinante HSP65 .

As microesferas de PLGA foram obtidas pelo método de emulsão múltipla e evaporação do solvente orgânico. A eficiência de encapsulamento das formulações é mostrada na Tabela 2. Para a formulação contendo DMT (0,5 mg/formulação) a mesma foi adicionada na fase orgânica da emulsão água/óleo/água durante o processo de encapsulamento. O diâmetro das partículas foi determinado por difratometria a laser utilizando o equipamento LS230 - Small Volume Module Plus (Coulter, United States). Os resultados foram obtidos e expressos na forma de mediana e mostrados na tabela 2. O diâmetro das microesferas de acordo com as formulações não é uniforme, mas são caracterizadas por distribuição Gaussiana, que confirma que o método utilizado na obtenção das microesferas originou partículas com perfil de distribuição inferior a 10 μm , o qual é considerado adequado para a fagocitose de APCs.

Tabela 2. Taxas de encapsulamento (“load”) e diâmetro médio das Microesferas obtidas.

Microesferas	Taxa de encapsulamento [$\mu\text{g}/\text{mg}$]	Diâmetro médio(μm)
pVAX-Hsp65/DMT	4,97	7,3
Hsp65 recombinante	1,70	4,8

5.4- Quantificação de endotoxina bacteriana nas formulações vacinais

Com a finalidade de avaliar a quantidade de endotoxina presente nas formulações vacinais, utilizamos o teste “*Limulus Amebocyte Lysate*” (LAL), através do qual obtivemos índices de endotoxina menores que 0,1 EU/ μ g de DNA, portanto aceitáveis para testes “in vivo”, como recomendado pela farmacopéia americana e européia.

Tabela 3. Níveis de endotoxinas presentes nas formulações obtidas.

Amostras	UE/μg
pVAX-Hsp65	< 0,0001
Microesfera pVAX-Hsp65/DMT	< 0,0001
Microesfera Hsp65 recombinante	< 0,0001
Lipossoma	< 0,0001

UE/ μ g: Unidades de Endotoxina por micrograma de amostra

5.5- Produção de Anticorpos anti-Hsp65 específicos

Para avaliarmos se a imunização com as diferentes estratégias vacinais induziram nos camundongos a produção de anticorpos específicos para a Hsp65, o soro dos animais foi coletado 15 dias após a última imunização e foi realizada a detecção dos isotipos IgG2a e IgG1 através do método de ELISA, sendo esses isotipos compatíveis com a resposta do tipo Th1 e Th2 respectivamente. Como resultado observamos que a imunização com quatro doses de DNA-Hsp65 induziu um aumento significativo dos dois isotipos de anticorpos, quando comparado com os grupos salina e não imunizado (Figura 4). Não existiu diferença significativa entre os isotipos o que indicou um padrão misto de resposta.

A produção desses dois isotipos de anticorpos foi verificada também nos grupos microesfera e “prime-boost”. Esses grupos induziram a produção significativa dos dois isotipos de anticorpos quando comparados com os grupos PBS e não imunizado, mas esse aumento foi significativamente menor do que o induzido pelas quatro doses de DNA-Hsp65. Entretanto ao avaliarmos o grupo Lipossoma não obtivemos o mesmo padrão de resposta, pois observamos a produção dos dois isotipos de anticorpos semelhante a dos grupos não imunizados e salina (Figura 4).

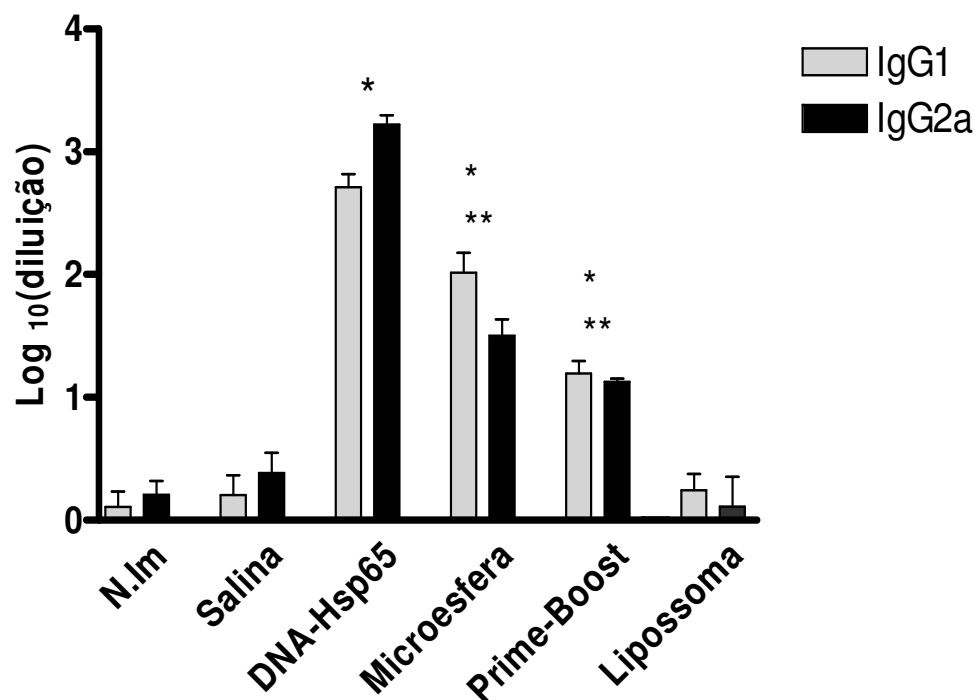


Figura 4. Determinação da produção de anticorpos no soro de camundongos BALB/c imunizados com diferentes estratégias vacinais. Os animais foram imunizados por injeção intramuscular com 4 doses de 100 µg de DNA-Hsp65 ou com as diferentes estratégias vacinais de acordo com o delineamento experimental. O grupo N.Im não foi imunizado. Os níveis de anticorpos anti-Hsp65 (IgG1/IgG2a) foram determinados por ELISA. Os resultados são representados pela conversão da diluição para logaritmo decimal. A diferença estatística da produção foi considerada como significativa quando $p < 0,05$.

*Comparação com o grupo NI e salina

**Comparado com o grupo DNA-Hsp65

5.6- Avaliação da resposta imune protetora induzida pelas diferentes estratégias de imunização contendo DNA-Hsp65

Com a finalidade de avaliar a atividade protetora das diferentes formulações vacinais, camundongos foram imunizados e posteriormente desafiados com *M. tuberculosis*. Foram avaliados diversos parâmetros imunológicos no pulmão, dentre eles: a produção de citocinas, contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) e perfil histopatológico do tecido pulmonar incluindo análise morfométrica.

5.6.1- Detecção da produção de citocinas no pulmão

Como foi descrito anteriormente, as citocinas associadas à proteção para TB, são aquelas características da resposta imune de padrão Th1 como IL-12 e IFN γ . Portanto o primeiro parâmetro a ser analisado foi à produção dessas citocinas bem como outras citocinas incluindo IL-10 e IL-4. Após 30 dias do desafio com *M. tuberculosis* os animais foram sacrificados e os pulmões foram homogeneizados para dosagem da citocinas por ELISA.

5.6.1.1-ELISA

Os resultados revelaram que todos os grupos infectados com *M. tuberculosis* induziram a produção significativa de IFN- γ e IL-12 quando comparado com o grupo não infectado (Figuras. 5 e 6 respectivamente). No entanto, quando os animais foram previamente vacinados com DNA-Hsp65 com quatro doses via intramuscular, os níveis de IFN- γ tiveram uma diferença significativa quando comparado com os animais só infectados. O mesmo foi observado quando os animais foram previamente imunizados com microesferas, Lipossoma e “prime-boost”. Não observamos diferença significativa entre os grupos imunizados com as estratégias descritas anteriormente. Com relação à produção de IL-12 não foi observada diferença significativa entre os grupos de animais imunizados com

as diferentes estratégias em relação ao grupo infectado que só recebeu salina (chamado grupo infectado de aqui em diante).

A produção da citocina IL-10 (Figura. 7) também foi avaliada nesse sistema e observou-se diminuição significativa nos grupos DNA-Hsp65, microesfera, lipossoma e “prime-boost” quando comparados com o grupo só infectado.

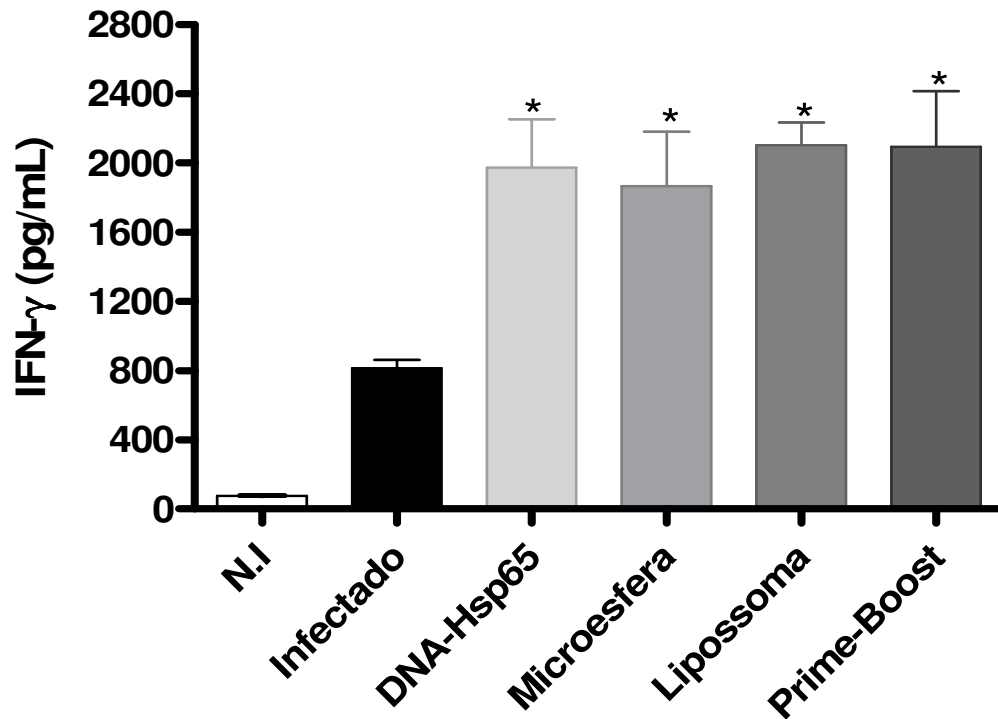


Figura 5. Produção de IFN- γ no homogenato pulmonar de camundongos BALB/c imunizados e desafiados com *M. tuberculosis*. Os animais foram imunizados por injeção intramuscular com 4 doses de 100 μ g de DNA-Hsp65 ou com as diferentes estratégias vacinais. Após 15 dias da última imunização, os camundongos foram desafiados com 10^4 bacilos de *M. tuberculosis* por via intratraqueal. Trinta dias após o desafio, foi realizada a determinação da produção de citocinas por ELISA. Os resultados são representados pela média $\pm$ desvio padrão de cada grupo. A diferença estatística da produção foi considerada como significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo infectado.

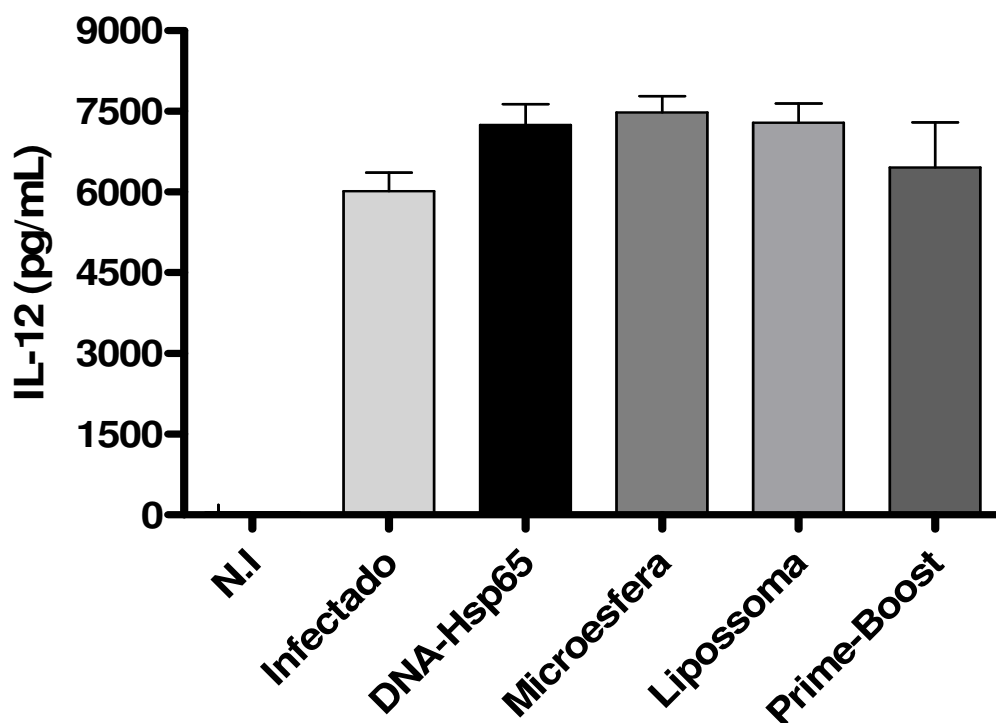


Figura 6. Produção de IL-12 no homogenato pulmonar de camundongos BALB/c imunizados e desafiados com *M. tuberculosis*. Os animais foram imunizados por injeção intramuscular com 4 doses de 100 µg de DNA-Hsp65 ou com as diferentes estratégias vacinais. Após 15 dias da última imunização, os camundongos foram desafiados com 10^4 bacilos de *M. tuberculosis* por via intratraqueal. Trinta dias após o desafio, foi realizada a determinação da produção de citocinas por ELISA. Os resultados são representados pela média $\pm$ desvio padrão de cada grupo. A diferença estatística da produção foi considerada como significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo infectado.

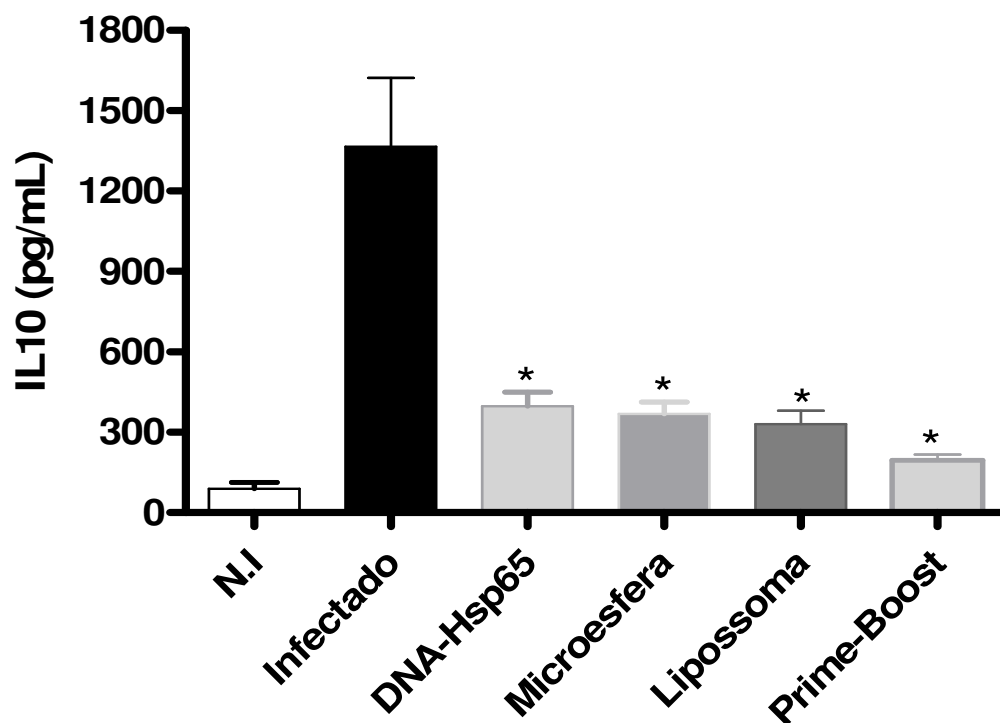


Figura 7. Produção de IL-10 no homogenato pulmonar de camundongos BALB/c imunizados e desafiados com *M. tuberculosis*. Os animais foram imunizados por injeção intramuscular com 4 doses de 100 µg de DNA-Hsp65 ou com as diferentes estratégias vacinais. Após 15 dias da última imunização, os camundongos foram desafiados com 10^4 bacilos de *M. tuberculosis* por via intratraqueal. Trinta dias após o desafio, foi realizada a determinação da produção de citocinas por ELISA. Os resultados são representados pela média $\pm$ desvio padrão de cada grupo. A diferença estatística da produção foi considerada como significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo infectado.

5.6.2- Detecção de citocinas produzidas por células do pulmão

Outro método utilizado para análise da produção de citocinas foi ELISPOT, sendo esse método mais adequado que o método de ELISA, uma vez que ele determina a produção de citocinas pela célula do tecido pulmonar. Foram avaliadas por esse sistema as citocinas IFN- γ e IL-4 sendo que os valores do grupo não infectado foram descontados dos apresentados pelos demais grupos experimentais. Os resultados mostram a presença de células produtoras de ambas as citocinas em todos os grupos experimentais em presença dos estímulos específico (rHsp65) e inespecífico (Con-A). O número de células produtoras de IFN- γ , como mostra a figura 8, foi significativamente maior para todos os grupos imunizados com as diferentes estratégias vacinais quando comparado com os grupos BCG e infectado. Por outro lado, o número de células produtoras de IL-4 foi menor que as produtoras de IFN- γ . Neste caso não foi observada diferença entre os grupos analisados. Quanto ao grupo BCG não obtivemos diferença significativa nas células produtoras de IFN- γ ou IL-4 quando comparado com o grupo infectado.

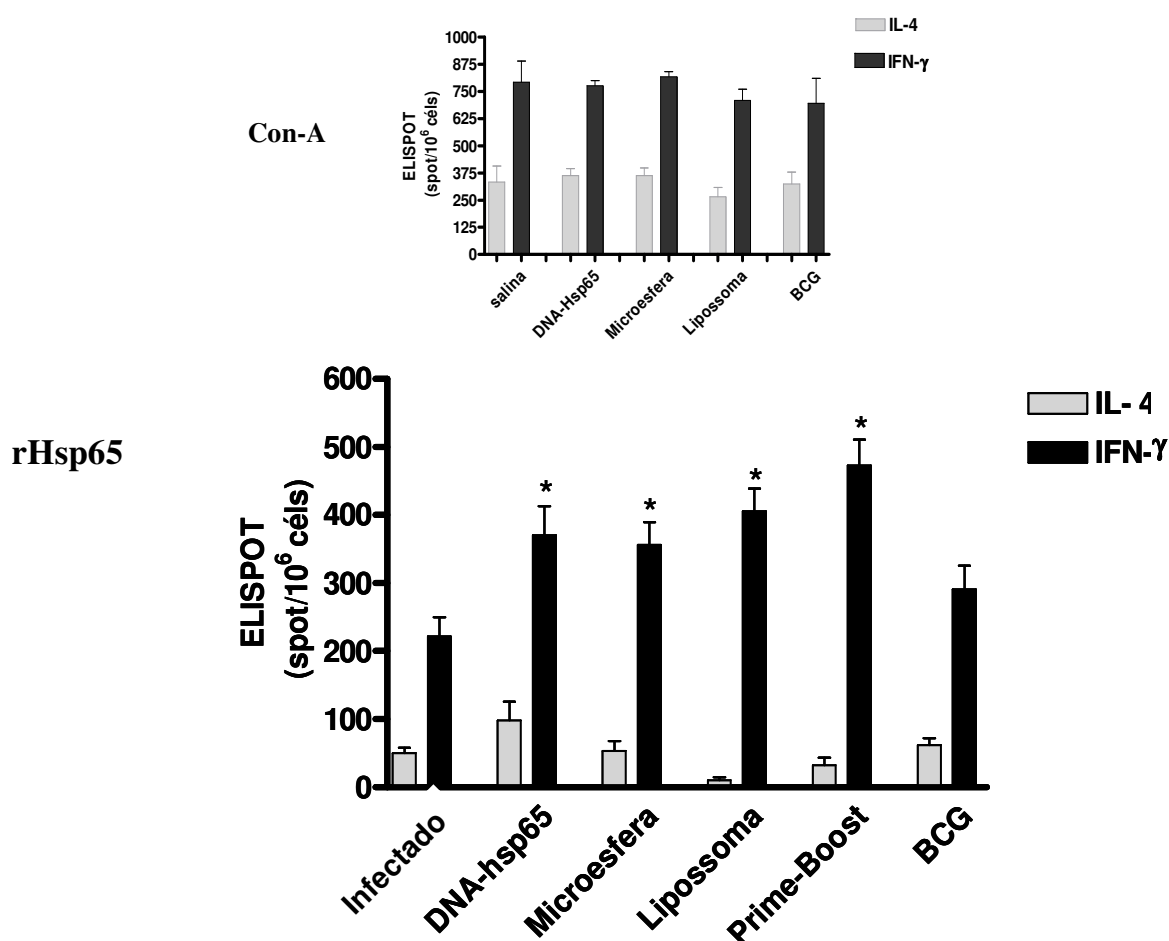


Figura 8. Produção de IL-4 e IFN-γ por células do pulmão de camundongos BALB/c imunizados e desafiados com *M. tuberculosis*. Os animais foram imunizados por injeção intramuscular com 4 doses de 100 µg de DNA-Hsp65 ou com as diferentes estratégias vacinais. Após 15 dias da última imunização, os camundongos foram desafiados com 10⁴ bacilos de *M. tuberculosis* por via intratraqueal. Trinta dias após o desafio, foi realizada a determinação da produção de citocinas por Elispot perante os estímulos de rHsp65 e Con-A. Os resultados são representados pela média ± desvio padrão de cada grupo. A diferença estatística da produção foi considerada como significativa quando *p<0,05 em relação ao grupo infectado e BCG.

5.6.3- Recuperação de unidades formadoras de colônia (UFC) no pulmão de animais infectados

No ensaio de proteção foi avaliado o número de UFCs de micobactéria por pulmão. Para isso, após a imunização dos animais as diferentes estratégias vacinais, os animais foram desafiados com *M. tuberculosis* por via intratraqueal e 30 dias após o desafio, analisamos a atividade protetora dessas formulações e estratégias. Os pulmões foram processados como descrito no item 4.13.1 e 4.13.2 e o número de UFCs foi determinado com 27 dias após a incubação das micobactérias coletadas. Verificamos que o grupo BCG foi o grupo que apresentou a maior redução de UFC quando comparado com os grupos imunizados com as diferentes formulações vacinais, sendo essa diferença significativa de 1,5 logs para os grupos citados e 2,85 logs de redução em relação ao grupo infectado. Contudo os grupos imunizados com as diferentes estratégias apresentaram uma redução significativa de 1,35 logs em relação ao grupo infectado, mostrando a eficácia das formulações e estratégias empregadas.

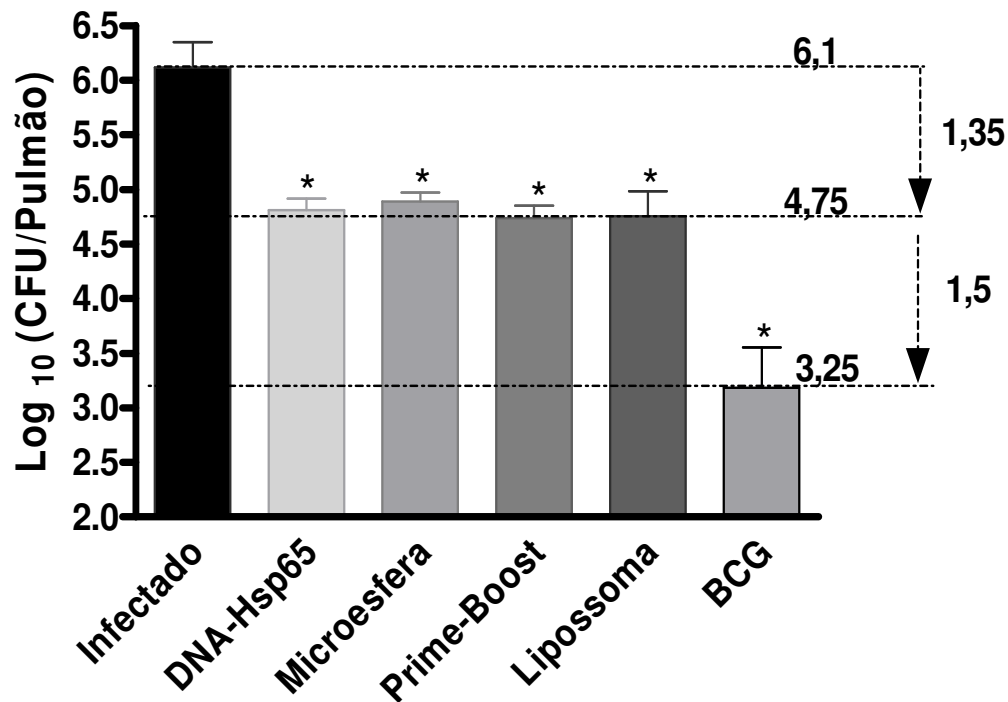


Figura 9. Número de unidades formadoras de colônia (UFC) no pulmão de camundongos BALB/c imunizados e desafiados com *M. tuberculosis*. Os animais foram imunizados por injeção intramuscular com 4 doses de 100 µg de DNA-Hsp65 ou com as diferentes estratégias vacinais. Após 15 dias da última imunização, os camundongos foram desafiados com 10⁴ bacilos de *M. tuberculosis* por via intratraqueal. Trinta dias após o desafio, os animais foram mortos e o pulmão coletado e as células plaqueadas em meio de cultura 7H11. Após 27 dias de cultura, o número de UFCs foi determinado. Os resultados são representados em log₁₀ ± desvio padrão da CFU/Pulmão de cada grupo. A diferença estatística da produção foi considerada como significativa quando *p<0,05 em relação ao grupo infectado.

5.6.4 - Análise histopatológica do Pulmão

Outro parâmetro de grande importância analisado nesse trabalho foi a análise histopatológica do pulmão dos animais infectados. Essa análise é essencial para avaliar a eficácia de novas vacinas uma vez que a resposta inflamatória induzida pelas estratégias vacinais propostas, pode levar a uma redução não só das UFCs, mas também deve ser capaz de não comprometer o parênquima pulmonar. Dessa forma analisamos os pulmões de animais imunizados e desafiados com *M. tuberculosis*. Trinta dias após o desafio os animais foram sacrificados e os pulmões coletados e corados conforme item 4.14 para a análise histopatológica do tecido pulmonar.

O grupo não infectado corresponde ao parênquima pulmonar normal. Por outro lado, o grupo de animais infectados que recebeu salina no lugar das vacinações, apresentou uma pneumonia tuberculosa com comprometimento acentuado do parênquima pulmonar apresentando infiltrado inflamatório difuso caracterizado pela presença de células mononucleares de localização intraalveolar associado à presença do BALT (do inglês: bronchus-associated lymphoid tissue-Tecido linfóide associado ao brônquio). Já nos grupos imunizados com as diferentes estratégias vacinais, verificamos menor comprometimento pulmonar. O infiltrado celular nesses grupos está mais localizado, com presença de células mononucleares e restrição do processo inflamatório sendo esse infiltrado menor que o observado no grupo infectado. Esse resultado sugere que a resposta imune foi mais efetiva o que determinou uma menor lesão nesses grupos como mostram as figuras 10, 11 e 12. Dentre os grupos experimentais analisados, os animais imunizados com lipossomas apresentaram menor número de focos inflamatórios em relação aos outros grupos. Já o grupo que foi imunizado com BCG o parênquima pulmonar está mais preservado com pequeno infiltrado peribronquiolar e congestão mínima do tecido quando comparado com os demais grupos.

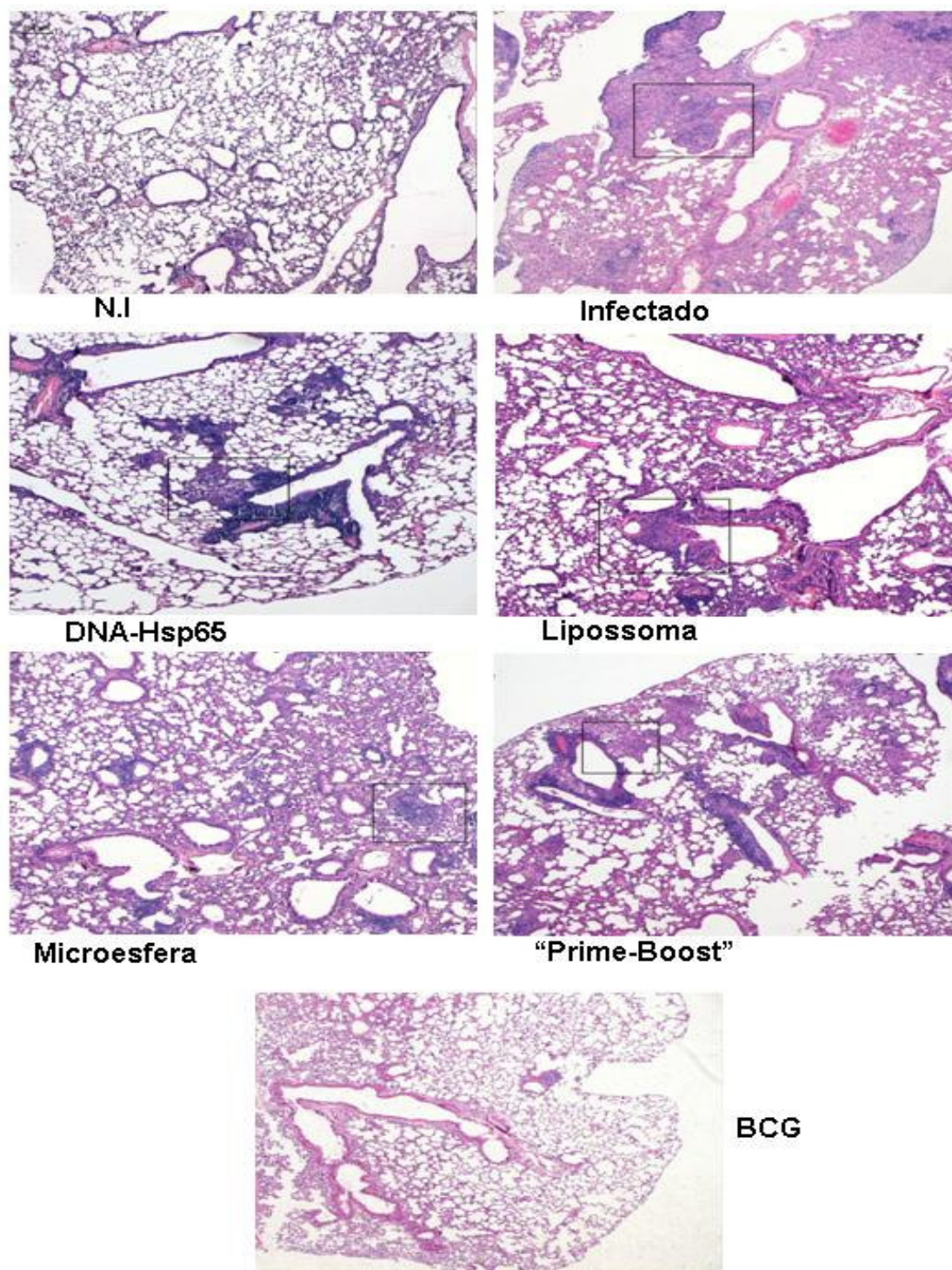


Figura 10. Cortes histológicos do pulmão de camundongos BALB/c imunizados e desafiados com *M. tuberculosis*. Os animais foram imunizados com as diferentes estratégias vacinais. Após 15 dias da última imunização, os camundongos foram desafiados com 104 bacilos de *M. tuberculosis* por via intratraqueal. Após 30 dias do desafio os animais foram sacrificados e os pulmões coletados para a análise histológica. Os cortes foram corados por hematoxilina e eosina e observado em microscópio óptico com aumento original de 50x, o detalhe está demonstrado na Figura 12.

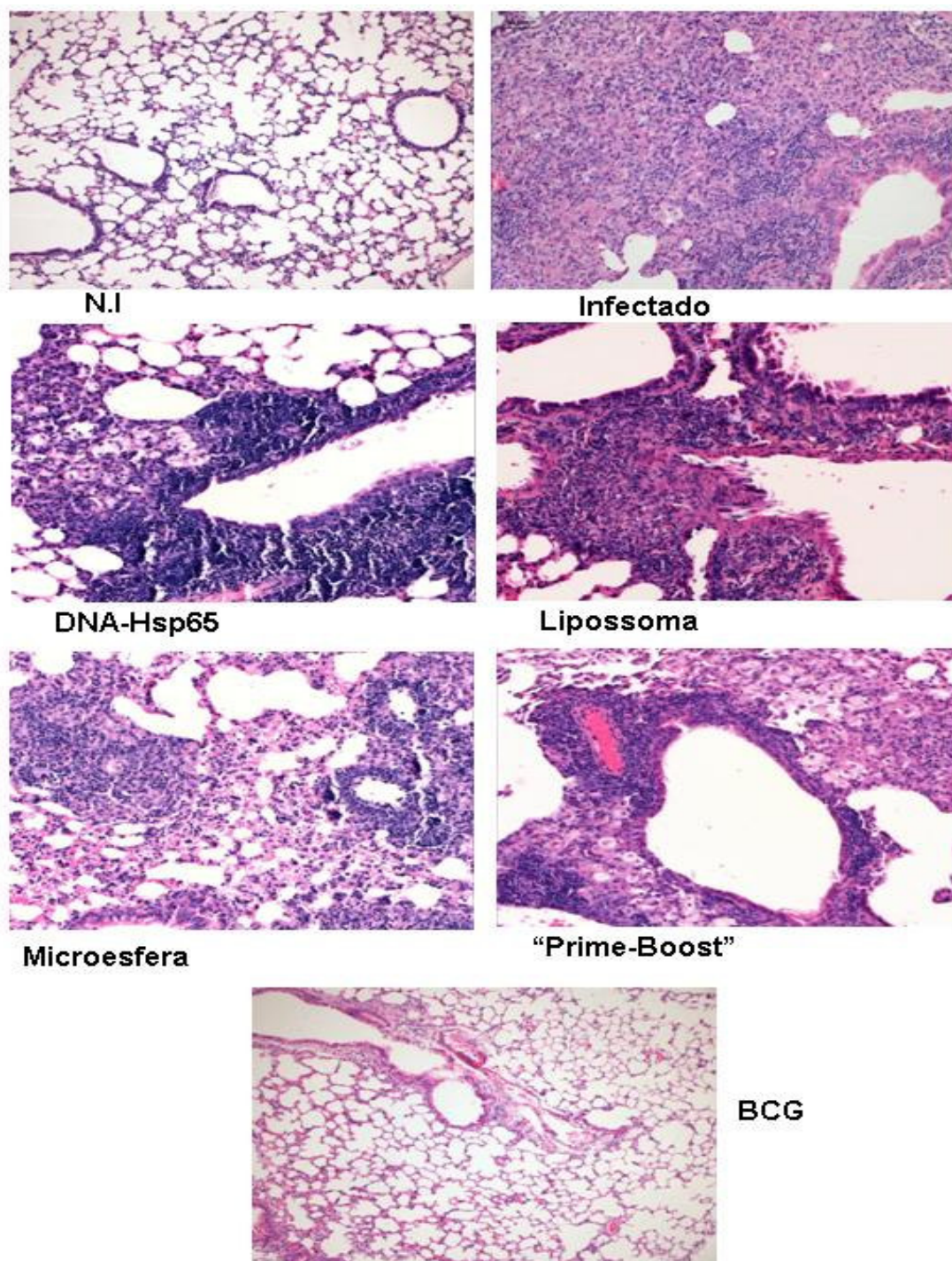


Figura 11. Cortes histológicos do pulmão de camundongos BALB/c imunizados e desafiados com *M. tuberculosis*. Os animais foram imunizados com as diferentes estratégias vacinais e 15 dias após a última imunização, os camundongos foram desafiados com 10^4 bacilos de *M. tuberculosis* por via intratraqueal. Após 30 dias do desafio os animais foram sacrificados e os pulmões coletados para a análise histológica. Os cortes foram corados por hematoxilina e eosina e observado em microscópio óptico com aumento original de 200x.

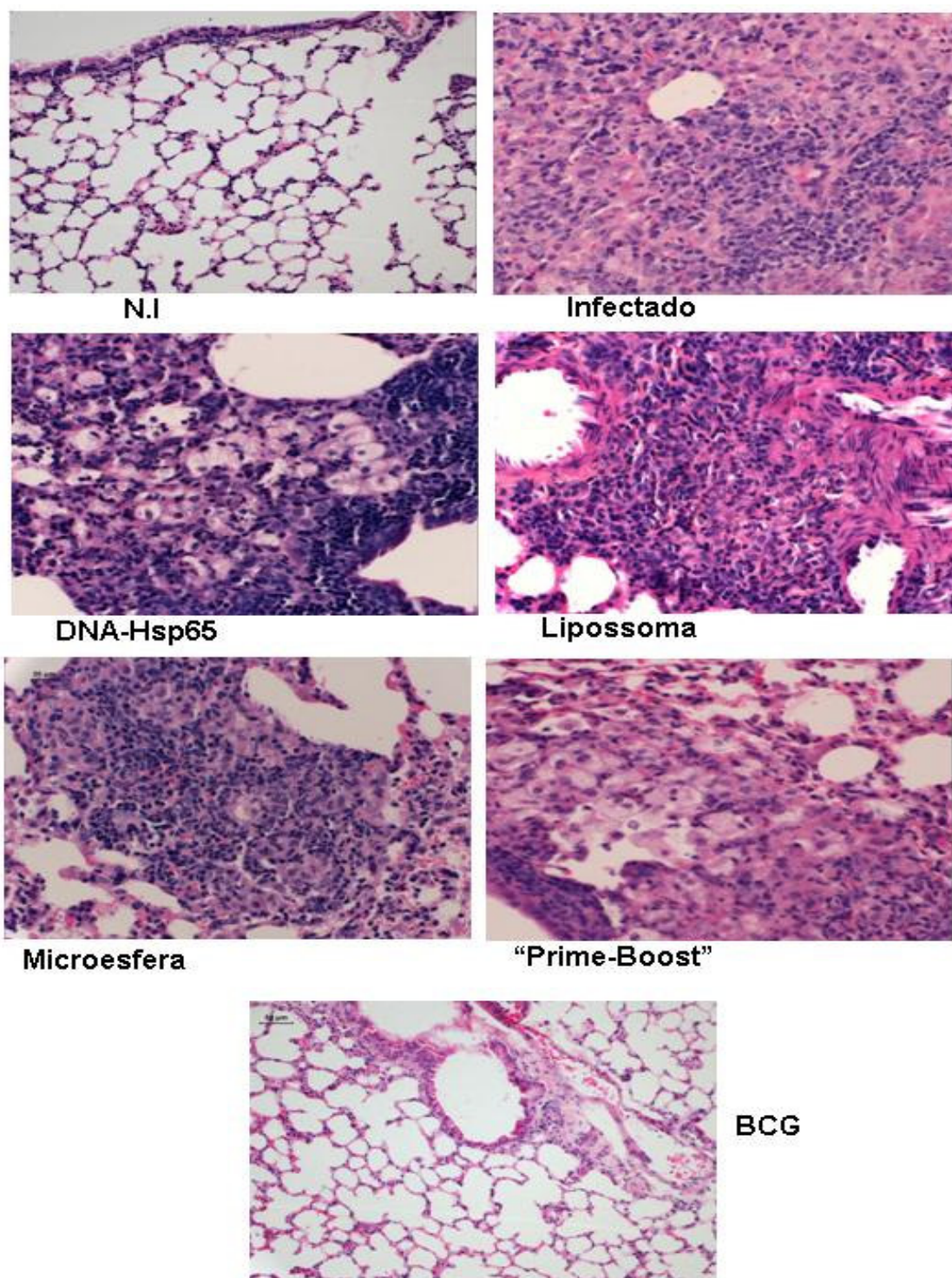


Figura 12. Cortes histológicos do pulmão de camundongos BALB/c imunizados e desafiados com *M. tuberculosis*. Os animais foram imunizados com as diferentes estratégias vacinais e após 15 dias da imunização, os camundongos foram desafiados com 10^4 bacilos de *M. tuberculosis* pela via intratraqueal. Após 30 dias do desafio os animais foram sacrificados e os pulmões coletados para a análise histológica. Os cortes foram corados por hematoxilina e eosina e observado em microscópio óptico com aumento original de 400x.

5.6.5- Análise Morfométrica do tecido pulmonar

Uma forma de comparar quantitativamente o infiltrado inflamatório do tecido pulmonar é através da análise morfométrica. Para tal procedimento os grupos imunizados com as diferentes formulações contendo DNA-Hsp65, lipossoma, microesfera, “prime-boost” assim como as quatro doses de DNA-Hsp65 demonstraram redução significativa da área de inflamação no pulmão quando comparados com o grupo infectado. O mesmo foi observado para o grupo BCG, sendo a redução da área inflamada maior do que a observada para os outros grupos experimentais (Figura 13). Assim, esses resultados são compatíveis com o perfil observado pela análise histopatológica bem como de UFCs.

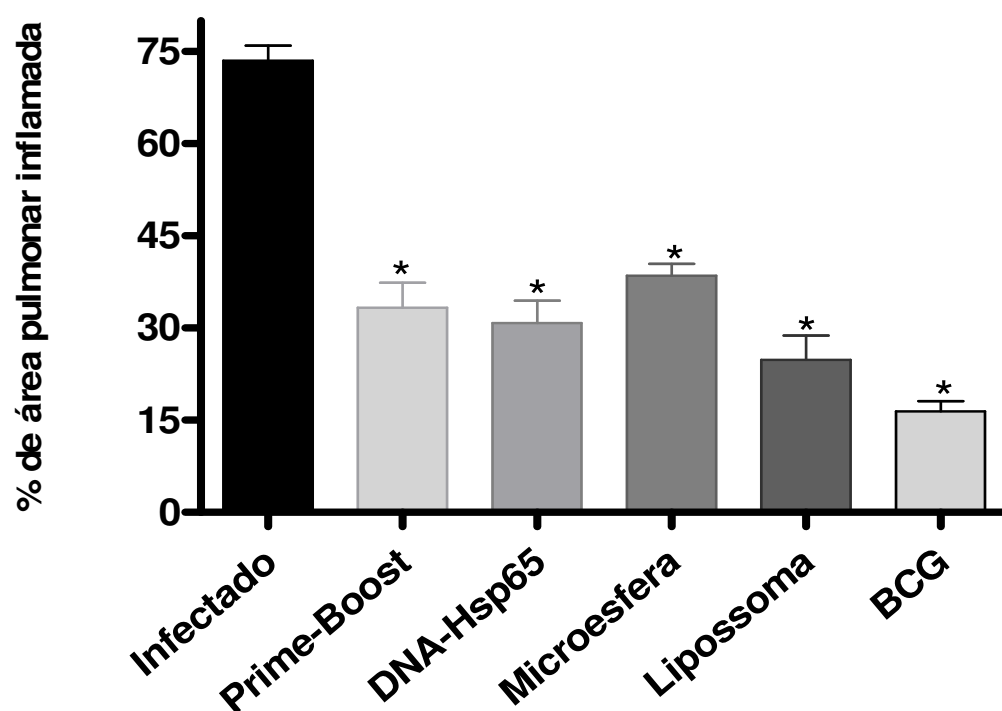


Figura 13. Análise morfométrica do infiltrado inflamatório no pulmão de camundongos BALB/c imunizados e desafiados. Os animais foram imunizados por injeção intramuscular com 4 doses de 100 µg de DNA-Hsp65 ou com as diferentes estratégias vacinais. Após 15 dias da última imunização, os camundongos foram desafiados com 10^4 bacilos de *M. tuberculosis* por via intratraqueal. Trinta dias após o desafio, os animais foram mortos e os seus pulmões coletados para análise histológica. Os cortes foram analisados com o auxílio de graticulo como mostra a Figura 1. A diferença estatística da produção foi considerada como significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao grupo infectado.

6- DISCUSSÃO

Nos últimos anos o estudo de estratégias para o desenvolvimento de novas vacinas tem se tornado o grande objetivo de muitos grupos de pesquisa. O avanço na purificação de elementos microbianos, engenharia genética e uma melhor compreensão da resposta imune protetora para várias patologias, direcionam a criação de diversas vacinas através da manipulação de DNA, RNA, proteínas e polissacarídeos (PLOTKIN S A, 2005). Ao mesmo tempo, o progresso na implementação de novas estratégias de vacinação trouxe a possibilidade de desenvolver vacinas mais eficazes, seguras e de baixo custo.

Existe atualmente a necessidade urgente de desenvolver vacinas eficazes para mais de 20 doenças incluindo AIDS, TB e Hepatite C (ALPAR, 2005). Com relação à TB, a grande variabilidade da eficácia do BCG, o aparecimento de cepas multi-droga resistentes, bem como a coinfeção TB-HIV, demonstram a necessidade de desenvolver uma vacina, mais eficaz e segura, ou seja, que realmente previna o espalhamento da infecção, assim como de novos recursos imunoterapêuticos para o combate ao grande número de indivíduos infectados e à doença propriamente dita (MARTÍN, 2005; BRINTTON & PANDERIA, 2003).

Como já mencionado anteriormente, a utilização da proteína Hsp65 como vacina anti-TB, vem sendo estudada por SILVA e colaboradores desde 1992. Esses autores publicaram diversos trabalhos demonstrando a atividade profilática e terapêutica da vacina de DNA-hsp65 na TB murina experimental (BONATO *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 1999; LOWRIE *et al.*, 1999; LIMA *et al.*, 2003; BONATO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005). Dando continuidade a esses estudos, foram implementadas novas estratégias vacinais visando a diminuição da dose de DNA e o número de imunizações para melhorar a eficácia e segurança dessa vacina. Com esse intuito nosso trabalho teve como objetivo otimizar a vacina de DNA-Hsp65 administrada originalmente em quatro doses totalizando 400µg, para a obtenção de um esquema de imunização com menor número de doses e conseqüente redução na quantidade de DNA, que ative o sistema imune de forma eficaz na proteção contra a TB.

Nesse sentido foram escolhidas duas formulações: microesferas e lipossomas, visando um melhor direcionamento do antígeno vacinal para as APCs, com diminuição da dose de DNA bem como do número de imunizações. Além dessas, a estratégia de “prime-boost” também foi estudada com os mesmos objetivos. Assim, o presente trabalho demonstrou as propriedades imunogênicas e protetoras das diferentes estratégias vacinais contendo DNA-Hsp65.

Uma das principais preocupações com relação às vacinas de DNA é a etapa de construção da mesma, uma vez que o gene alvo precisa ser expresso de forma correta, o que faz necessária a caracterização da construção plasmideal de forma qualitativa após a sua produção. O parâmetro por nós avaliado para determinar a presença do gene Hsp65 de *M. leprae* na composição vacinal foi análise de restrição utilizando a enzima *BamHI*. Como resultado obtivemos que a digestão do pVAX-Hsp65 produziu uma banda de 6,0 kb, representando a linearização do vetor e do inserto da Hsp65, ambos com 3,0 kb. Com relação à proteína recombinante Hsp65 expressa em *Escherichia coli* foi importante avaliar se o processo de purificação foi eficaz para a retirada de possíveis contaminantes provenientes desse sistema de expressão. Para tal, foi feito gel de poliacrilamida SDS/PAGE 10% para avaliar a pureza da proteína produzida. O resultado mostrou uma banda única cujo perfil eletroforético corresponde à proteína rHsp65 livre de contaminantes. Esse dado é importante para determinar que a resposta desencadeada para a formulação composta pela rHsp65 não teve nenhuma influência de outras proteínas do sistema de expressão utilizado.

Avaliando ainda a ocorrência de contaminantes, a presença de endotoxinas bacterianas como o LPS também foi analisado, devido ao fato do mesmo ser um produto de bactérias gram negativas que é capaz de imunomodular APCs, promovendo a maturação, aumento na expressão de moléculas co-estimulatórias e liberação de citocinas que direcionam a resposta imune para um perfil Th1 (HAWKINS *et al.*, 2003). O resultado obtido dos níveis de LPS em todas as formulações vacinais foi considerado aceitável para testes “in vivo” de acordo com a Farmacopéia Européia que preconiza que o limite de

contaminação por endotoxina, para medicamentos administrados por via endovenosa, não ultrapasse 5 UE/Kg peso corpóreo/hora. Assim, um camundongo com peso médio de 20g pode receber até 0,1UE/animal/hora.

Verificamos também o tamanho das microesferas obtidas, uma vez que essa característica é fundamental para o potencial adjuvante das microesferas. Microesferas com diâmetro na faixa de 1 a 10 μm são muito grandes para entrar nas células por endocitose sendo então fagocitadas por células como macrófagos e células dendríticas. Deste modo, o encapsulamento do antígeno em microesferas favorece o seu contato com as APCs. Já as partículas com diâmetro maior que 10 μm seriam responsáveis pela formação de um depósito e liberação do antígeno por um período prolongado (CLELAND, 1995; O'HAGAN *et al*, 1993). Além disso, a possibilidade de liberação dos antígenos dentro da célula poderia favorecer a resposta do tipo Th1 uma vez que o antígeno é liberado no citosol e geralmente processado e apresentado via MHC de classe I. Trabalhos publicados na literatura têm explorado essa característica das microesferas o que tem sido muito útil no desenvolvimento de novas vacinas (WAECKERLE-MEN *et al*, 2005; CAI, 2005).

Outra característica importante com relação a polímeros usados como sistema de liberação para vacinas é a sua composição, uma vez que dependendo do composto utilizado, pode ocorrer o encapsulamento do antígeno de forma ineficiente, bem como reduzir a liberação do mesmo além de poder causar citotoxicidade ao organismo (O'HAGAN, *et al* 2004). Nesse intuito, a escolha de um adjuvante que potencializasse a ação das microesferas bem como o polímero foi importante para o nosso trabalho. O polímero por nós utilizado foi o PLGA que é composto pela associação de poli-ésteres de ácido láctico e glicólico que formam um composto biodegradável e biocompatível que é degradado pela via do ácido cítrico sem produzir compostos tóxicos ao organismo, além de ser liberado para uso clínico na composição de fios de sutura e de implantes (LEWIS, 1990). Adicionalmente, já foram descritos resultados promissores da sua utilização como sistemas de liberação de vacinas em modelo animal e testes clínicos em humanos (BANGA, 2005; O'HAGAN, *et al* 2004). A escolha do adjuvante parte do princípio de que para formar uma

vacina de subunidade eficaz é necessário associar o antígeno a um adjuvante com propriedades imunoestimulatória e a um carreador (revisto por O'HAGAN & VALIANTE 2003). O adjuvante por nós escolhido para a microesfera de DNA-Hsp65 foi o dimicolato de trealose (DMT), um componente da parede de micobactérias que já foi utilizado pelo nosso grupo na composição das microesferas de PLGA. Este composto mostrou ser potencializador da resposta imune em camundongos BALB/c previamente vacinados com as microesferas e posteriormente desafiados com linhagem virulenta de *M. tuberculosis* (LIMA *et al*, 2003). Os dados apresentados sobre o controle de qualidade das diferentes formulações: Lipossomas carregados com o DNA-Hsp65 na superfície; microesferas de DNA-Hsp65 de liberação rápida juntamente com microesferas de rHsp65 de liberação lenta administradas em uma única dose; DNA-Hsp65 utilizado na estratégia de “prime-boost” e nas 4 doses de DNA, demonstraram o sucesso da sua obtenção e permitiu a sua utilização nos modelos propostos.

O próximo passo foi avaliar a resposta imune humoral desenvolvida nos camundongos em resposta a essas formulações, uma vez que ela é importante para a defesa do hospedeiro contra bactérias patogênicas. A avaliação da produção de anticorpos específicos contra Hsp65 é um importante indicador da transcrição correta do gene contido na vacina de DNA assim como do tipo de resposta celular gerada (Th1/Th2). Isso, porque a troca de isotipos de anticorpos está diretamente relacionada com as citocinas produzidas pelas células T auxiliares (ABBAS 2005). CRAFT & SWAIN em 1991 relataram que citocinas de padrão Th2 como IL-4 estão relacionadas com a produção de anticorpos do isotipo IgG1, enquanto que citocinas de padrão Th1 como IFN- γ , estão relacionadas com a produção de IgG2a. Os nossos resultados demonstram que as estratégias de microesfera e “prime-boost”, foram capazes de produzir anticorpos específicos anti-Hsp65 (IgG1 e IgG2a) caracterizando um padrão misto de resposta. Esses resultados são compatíveis com dados do nosso grupo que mostraram o desenvolvimento de um padrão misto de resposta humoral utilizando o plasmídeo pcDNA3-Hsp65 nu ou incorporado em microesferas de PLGA (LIMA *et al*, 2003). O mesmo foi observado utilizando a estratégia de “prime-boost” com

microesferas PLGA contendo DNA-Hsp65 e rHsp65 (RUBERTI, 2004), estratégia similar à proposta por esse trabalho. Demonstramos que mesmo com a redução da quantidade de DNA utilizado nas formulações de microesfera e “prime-boost” o mesmo perfil de resposta foi observado para produção de anticorpos quando comparado com quatro doses de DNA-Hsp65. No entanto, a quantidade de ambos tipos de anticorpos foi maior no grupo imunizado com DNA nu e o grupo lipossoma não apresentou diferença significativa na produção desses anticorpos quando comparado com o grupo não imunizado e salina.

Devido ao fato da aplicação dessa formulação ter sido realizada pela via intranasal, o isotipo a ser analisado deveria ter sido o IgA como já é descrito por diversos grupos (ALMEIDA, *et al*, 1996, GREGORIADES *et al* 2002), pois em geral a administração sistêmica de antígenos vacinais gera a produção de anticorpos IgG. Em contraste, a administração de antígenos pela via intranasal resulta em uma maior produção de anticorpos do isotipo IgA no sítio de aplicação e podem ser detectados nas fezes ou nas placas de Peyer (HOMER L 2005). Nesse trabalho, avaliamos a produção de anticorpos IgA no soro dos animais, não sendo possível detectar níveis significativos desse isotipo.

Após avaliarmos a capacidade das formulações vacinais em desencadear uma resposta imune humoral, o próximo passo foi verificar o efeito dessas estratégias na indução de proteção contra a infecção por *M. tuberculosis*. Nesse sentido o primeiro parâmetro por nós observado foi o perfil de citocinas produzidas. Ambas as células TCD4+ e TCD8+ são essenciais na imunidade protetora para a TB, uma vez que as citocinas produzidas por elas estão envolvidas na resistência do hospedeiro à *M. tuberculosis*. Durante a infecção ocorre a ativação da resposta imune que resulta na produção de IL-12 e INF- γ que desempenham papel importante no desenvolvimento de uma resposta protetora (FLYNN, 2004). As principais estratégias desenvolvidas para a TB buscam estimular as células do sistema imune a produzirem citocinas de perfil Th1 (MARTÍN, 2005, FYNN & CHAN, 2001). Estudos mostram que animais deficientes na produção de IL-12 e IFN- γ são susceptíveis a infecções provocadas por micobactérias (COOPER *et al*, 1993; COOPER *et al*, 1997). Além do mais, indivíduos que possuem mutações para genes do receptor de IL-12 e apresentam redução

significativa na produção de IFN- γ são mais susceptíveis a infecções provocadas pelo *Mycobacterium avium* (Revisto por FLYNN & CHAN, 2001). Para infecções com *M.tuberculosis*, estudos relatam que a administração de vacina de DNA contendo o gene da IL-12 pode reduzir significativamente o número de bactérias em camundongos com a infecção crônica. Em função disso, acredita-se que a presença de células T efectoras e de memória produtoras de IFN- γ possa definir o direcionamento da resposta imune do hospedeiro diante de uma situação de infecção com *M. tuberculosis* (FLYNN *et al.*, 1995). Resultados obtidos pelo nosso grupo mostraram que a vacina DNA-Hsp65 é capaz de induzir uma resposta imune protetora com aumento na produção de IL-12 e IFN- γ em camundongos imunizados e posteriormente desafiados, desenvolvendo um padrão de resposta favorável para a proteção contra a TB (Revisto por SILVA, 1999).

As citocinas características de padrão Th2 também foram analisadas, uma vez que foi descrito recentemente que uma resposta Th1 exacerbada por si só não está diretamente relacionada com uma melhor proteção para TB, uma vez que camundongos imunizados com BCG expressando IL-18 que atua como agonista da IL-12 induzindo a produção de IFN- γ , não aumentou a eficácia de proteção para a vacina. Além do mais, a produção exacerbada de TNF- α que é reconhecida como protetora na TB, pode causar lesão tecidual, quando acontece a produção concomitante de IL-4 (ROOCK, 2005). O papel da IL-10 na infecção por *M. tuberculosis* continua controverso, enquanto alguns autores mostram que camundongos IL-10^{-/-} não respondem melhor à infecção (JUNQUEIRA-KIPNIS *et al.*, 2005; NORTH, 1998; JUNG *et al.*, 2003), outros indicam o contrário (MURRAY & YOUNG, 1999). IL-10 regula negativamente a ativação de linfócitos e macrófagos. Além disso, a maior parte dos trabalhos mostra que a IL-10 inibe a proliferação de células T, a produção de IL-12 e IFN- γ , diminui a expressão de moléculas coestimulatórias e a expressão de MHC classe I e II na superfície de APCs (TURNER *et al.*, 2002; ROJAS *et al.*, 1999 e FIORENTINO *et al.*, 1991). Nesse sentido, o desenvolvimento de vacinas contra a TB deve se basear na escolha de antígenos, bem como estratégias vacinais que estimulem a resposta Th1 e

fatores proinflamatórios regulados de forma adequada, além de inibir a produção de citocinas de perfil Th2. Além disso, é importante o monitoramento da eficácia vacinal através de ensaios que permitam a avaliação desses padrões de resposta (REED *et al.*, 2003).

Formulações como lipossomas e microesferas são descritas como potenciais ativadores da resposta imune de perfil Th1, uma vez que protegem o antígeno vacinal contra a ação de endonucleases, aumentando ou prolongando a expressão do antígeno, além de direcionarem o antígeno para as APCs aumentando a transfecção das mesmas e promovendo a ativação de linfócitos TCD4+ e TCD8+ (CAI, 2005, ALPAR, *et al* 2005).

Outra estratégia descrita como eficaz em gerar uma resposta protetora para TB é o “prime-boost” ou imunização heteróloga, que aumenta a imunogenicidade das células T induzidas pelo BCG (McSHANE & HILL, 2005). Deste modo a utilização dessas estratégias para otimização da vacina de DNA-Hsp65 poderia favorecer a indução de uma resposta imune protetora para TB. Para tal verificamos a produção de citocinas tanto Th1 (IL-12 e IFN- γ) como Th2 (IL-4 e IL-10). Os resultados obtidos mostraram um aumento significativo das citocinas IL-10, IL-12 e IFN- γ no grupo infectado em relação ao grupo não infectado, como já era esperado uma vez que a própria infecção é capaz de induzir a produção dessas citocinas (FLYNN, 2004). Mais importante foi observar que a produção de IFN- γ foi significativamente superior nos animais imunizados com as diferentes estratégias quando comparado ao grupo infectado, indicando que as estratégias propostas por esse trabalho são promissoras para o desenvolvimento de uma nova formulação a ser empregada como vacina anti-TB. Além disso, utilizando o método de ELSPOT, uma forma mais adequada para determinar a produção de citocinas, um padrão similar de resposta foi observado na produção de IFN- γ , mas nesse caso o número de células produtoras de IFN- γ foi significativamente maior no grupo lipossoma e “prime-boost” em relação ao controle que recebeu BCG. Esses resultados corroboram com trabalhos do nosso grupo que demonstraram que tratamento com DNA-Hsp65 é capaz de induzir um aumento do número

de células T produtoras de IFN- γ , associadas com a proteção para TB (BONATO, *et al*, 1998).

Considerando que estas estratégias possibilitam a redução da dose de DNA administrado, nos permite levantar a hipótese de que as mesmas melhoram o direcionamento do DNA às células fagocíticas. Esses resultados nos deixam animados para o uso clínico da vacina de DNA-Hsp65 utilizando essas estratégias, uma vez que uma das críticas para o uso de vacinas de DNA em animais de grande porte e humanos é a baixa eficiência de indução de uma resposta imune protetora. Nossos resultados mostram que por meio do emprego dessas formulações, é possível promover uma resposta Th1 expressiva, mesmo com a redução de pelo menos 4 vezes a quantidade de DNA empregada (BABIUK, *et al*, 2003).

Com relação às citocinas de padrão Th2, os resultados obtidos demonstraram que nos animais que foram imunizados com as diferentes estratégias vacinais, os níveis de IL-10 diminuíram significativamente quando foram comparados com o grupo infectado. Com relação a IL-4 não foi observada diferença significativa entre os grupos analisados em comparação com o grupo controle, confirmando assim, que as estratégias vacinais por nós utilizadas foram eficientes em desencadear uma resposta com perfil Th1 além de controlar a produção de citocinas de perfil Th2 o que atualmente é considerado importante para a eliminação do bacilo e para a preservação da arquitetura pulmonar (Revisto por DHEDA *et al.*, 2005 e ROOK *et al.*, 2005).

O desenvolvimento desse perfil de resposta, com diminuição de IL-10 e IL-4, somada com o aumento de IFN- γ melhorou a resposta contra o bacilo, uma vez que os grupos lipossoma, microesfera, DNA-Hsp65, “prime-boost” tiveram redução significativa de UFC quando comparada com o grupo infectado. Mesmo o grupo BCG que não produziu altos níveis de IFN- γ como demais grupos, obteve uma redução de UFC ainda maior. Essa resposta corrobora com dados da literatura que demonstram que BCG induz proteção substancial em camundongos desafiados com *M.tuberculosis* (BRANDT *et al*, 2002).

Os ensaios de proteção, analisados pela contagem do número de bacilos recuperados do pulmão, fornecem dados importantes para vacinas candidatas para a TB. Entretanto a análise histológica do pulmão tem se tornado cada vez mais necessária, uma vez que a resposta Th1 com produção de altos níveis de IFN- γ e principalmente TNF- α e TGF- β pode promover necrose pulmonar na presença de IL-4 (DHEDA *et al*, 2005). Contudo, a produção de citocinas proinflamatórias, juntamente com a redução da carga bacilar nem sempre reflete uma maior preservação do parênquima pulmonar. Trabalhos relataram que o uso de vacinas de DNA codificando a proteína Hsp60 e o Ag85A de *Mycobacterium tuberculosis* em camundongos desafiados via aerosol, não conferem proteção para TB, além de induzir o aparecimento de necrose e injúria pulmonar (Revisado por ORME, 2006). Nesse sentido, a avaliação histológica juntamente com análise morfométrica do pulmão dos animais são imprescindíveis para determinar a real eficácia das estratégias empregadas.

Como já era previsto pelo perfil misto de anticorpos bem como citocinas de padrão Th1 e pela redução do UFC, o parênquima pulmonar nos grupos que receberam as diferentes estratégias vacinais, apresentaram redução significativa da área inflamada, em relação ao grupo infectado. Além disso, esse processo inflamatório foi mais focalizado, com maior preservação do tecido pulmonar, sendo que o grupo dos animais imunizados com DNA-Hsp65 veiculado em lipossomas o processo inflamatório foi mais restrito.

Adicionalmente, outro parâmetro utilizado foi a análise morfométrica, que é uma melhor forma de avaliar o parênquima pulmonar quanto ao infiltrado inflamatório de forma quantitativa. Os resultados obtidos demonstram que a área afetada pela infecção dos animais que foram imunizados com as diferentes estratégias teve redução em 2 vezes o infiltrado inflamatório comparado com o grupo infectado. O resultado do grupo BCG confirmou os obtidos na determinação das UFC, apresentando menor área de infiltrado inflamatório em relação aos outros grupos analisados. Esses dados confirmam a análise histológica do tecido pulmonar, demonstrando que as formulações vacinais microesfera e lipossoma, bem como a estratégia de "prime-boost", foram eficazes para desencadear uma

resposta imune com perfil Th1 essencial na proteção contra TB, com redução da carga bacilar, conferindo uma maior preservação do parênquima pulmonar.

Os resultados obtidos com esse trabalho são promissores, uma vez que uma vacina para TB se faz necessária diante do quadro em que se encontra a população mundial perante essa moléstia. Várias vacinas estão sendo testadas por grupos de todo o mundo. Essas vacinas baseiam-se principalmente no BCG recombinante e vacinas de subunidade. Entre as várias cepas de BCG recombinante, candidatas a novas vacinas, encontra-se rBCG30, que expressa o antígeno 85B (Ag85B) de *M. tuberculosis*, BCG RD1, uma cepa de BCG na qual foram inseridos genes do complexo RD1 de *M. tuberculosis* e BCG Δ ure-Hly, que codifica o gene da listeriolisina de *L. monocytogene*. Essas vacinas estão sendo avaliadas em ensaios clínicos de fase I (KAUFMANN, 2006). No entanto, por se tratarem de vacinas atenuadas, oferecem alguns riscos, como reversão de virulência ou possível indução de patologia em situações de imunossupressão (ALPAR *et al*, 2005).

Entre as vacinas de subunidades candidatas, destacam-se Mtb72 em AS02A (adjuvante contendo monofosforil lipídio A), Ag85B-ESAT-6 em IC31 (adjuvante contendo oligodeoxynucleotideo e aminoácidos policatiônicos) que demonstraram eficiência na redução das UFCs em modelos experimentais quando comparadas com o grupo BCG e também estão em fase clínica I de avaliação. A desvantagem desse tipo de vacina é o uso de adjuvantes ainda não liberados para uso em humanos (KAUFMANN, 2006).

Da mesma forma, no nosso trabalho observamos uma redução no número de UFCs e uma maior preservação do parênquima pulmonar quando os animais foram vacinados com as diferentes estratégias de imunização. Além disso, nós utilizamos uma vacina de DNA veiculada em sistemas de liberação já utilizados em humanos, bem como a estratégia de “prime-boost” como estratégia de otimização da vacina BCG. Todas estas formulações e estratégias vacinais demonstraram eficácia na ativação da resposta imune contra a TB. Além disso, considerando que resultados recentes do nosso laboratório mostraram que a vacina DNA-Hsp65 não induz efeitos autoimunes em camundongos BALB/c (Soares, dissertação de mestrado), e pelo contrário melhora o quadro de diabetes e artrite

reumatóide em modelos experimentais (Santos-Júnior *et al.*, 2006 e artigo submetido), permitem afastar a hipótese de imunopatologia desencadeada pela vacinação com DNA-Hsp65 e outras vacinas de DNA (Revisto por Lowrie, 2006) como sugerido anteriormente (Revisto por Orme 2006). Em adição, resultados de ensaio clínico de fase I em pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço realizado pelo nosso grupo em colaboração com pesquisadores do INCOR e Hospital das Clínicas da USP de São Paulo, mostraram que essa vacina não provoca efeitos tóxicos quando administrada “in situ” (Michaluart *et al.*, artigo em redação).

Sendo assim, pode-se sugerir com nosso trabalho que utilizando novas estratégias vacinais, é possível otimizar a vacina de DNA-Hsp65 com redução da dose de DNA, e do número de imunizações. Essas estratégias não interferem nas características da vacina original que utilizando quatro doses de DNA (400µg), é capaz de induzir um perfil de resposta Th1, reduzir a carga bacilar, bem como o dano tecidual causado pela infecção. Esse mesmo perfil de resposta foi observado para as formulações lipossoma e microesfera, possivelmente devido ao fato dessas duas formulações promoverem uma maior expressão do antígeno vacinal, proteção do DNA, bem como maior transfecção das APCs. Resultado idêntico foi observado para a estratégia de “prime-boost”, que também não alterou o padrão de resposta do DNA mesmo em menores quantidades, provavelmente devido ao fato de induzir um aumento na resposta de células T de memória com a utilização do DNA-Hsp65 como “boost” para o BCG.

Diante do exposto, a formulação empregando lipossomas parece ser a mais promissora das estratégias por utilizar menor quantidade de DNA, seus componentes serem de fácil acesso e já estarem liberados para uso em humanos e devido ao fato dos nossos resultados mostrarem maior preservação do pênquima pulmonar. No entanto, já que a formulação baseada na utilização de microesferas utiliza estruturas que liberam o antígeno por um período mais prolongado que os lipossomas, deve se considerar a possibilidade que delas ativarem uma resposta imune mais duradoura. Nesse sentido, será interessante a avaliação dos parâmetros aqui analisados por um tempo maior que 30 dias.

Os resultados aqui obtidos abrem novas perspectivas para o estudo dessas formulações na vacinação contra a TB em modelos experimentais que sejam mais próximos do curso natural da doença em humanos, como cobaias e primatas não humanos, bem como avaliar essas formulações no esquema de terapia contra TB. Isso é completamente viável uma vez que os lipossomas e as microesferas já são liberados para uso em humanos, e são os principais sistemas de liberação utilizados para melhorar a eficácia das vacinas de DNA.

7- CONCLUSÕES

1- Os resultados da utilização dos sistemas de liberação controlada e a estratégia de “prime-boost”, para a otimização da vacina de DNA-Hsp65, indicaram que todos foram eficazes na indução de uma resposta imune protetora para TB.

2- Os sistemas de liberação controlada lipossomas e microesferas mostraram-se como os mais promissores na otimização da vacina DNA-Hsp65 para uso em humanos.

3- O fato de que todas as estratégias empregaram uma menor concentração de DNA em relação ao DNA nu, assim como a diminuição do número de imunizações, a hipótese proposta pelo nosso trabalho foi confirmada.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. *et al.* **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 5.ed. cap.9.
- ABEL, B. *et al.* Toll-Like Receptor 4 expression is required to control chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. **J. Immunol.**, v. 169: p. 3155-62, 2002.
- ADDAMS, D. O. The granulomatous inflammatory response. **Am. J. Pathol.**, v. 84: p. 164-91, 1976.
- ALLISON, A.C. & GREGORIADIS, G. Liposomes as immunological adjuvants. **Nature**, v.252: p.252, 1974.
- ALMEIDA A.J. *et al.* Nasal Delivery of Vaccines. **J. Drug Target**; v.3 p.455-67, 1996.
- ANDERSEN, P. TB vaccines: progress and problems. *Trends immunol.*, v. 22: p. 160-68, 2001.
- ALTARE, F. *et al.* Inherited interleukin 12 deficiency in a child with bacille Calmette-Guerin and Salmonella enteritidis disseminated infection **J. Clin. Invest.** v.102, p.2035-40, 1998.
- BALASUBRAMANIAN, R.P. *et al.* Structural and functional analysis of cationic transfection lipids: the hydrophobic domain. **Gene Ther.**, v.3: p.163-72, 1996.
- BANGHAM, A.D. *et al.* Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **J. Mol. Biol.**, v.13: p.238-52, 1965.
- BAROUCH, D. *et al.* Control of viremia and prevention of clinical AIDS in Rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. **Science**, v.290: p.486-92, 2000.
- BARRY, M.A. & JOHNSTON, S.A. Biological features of genetic immunization. **Vaccine** v.15: p.788-91, 1997.
- BEAN, A.G.D. *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 by lymphotoxin. **J. Immunol.** v.162, p.3504-11, 1999.
- BEHR, M.A. Comparative genomics of BCG vaccines. **Tuberculosis**, v.81, p.165-68, 2001.

- BEMBRIDGE, G.P *et al.* Respiratory syncytial virus infection of gene gun vaccinated mice induces Th2-driven pulmonary eosinophilia even in the absence of sensitisation to the fusion (F) or attachment (G) protein. **Vaccine**, v.19: p.1038-46, 2000.
- BOMFORD, R. Will adjuvants be needed for vaccines of the future? **Dev. Biol. Stand.**, v.92: p.13-17, 1998.
- BONATO, V. L. D. *et al.* Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. **Infect. Immun.**, v.66: p.169-75, 1998.
- BONATO, V.L.D *et al.* Immune regulatory effect of pHSP65 DNA therapy in pulmonary tuberculosis: activation of CD8+ cells, interferon- γ recovery and reduction of lung injury. **Immunology**, v.113, p.130-38, 2004.
- BRANDT, L *et al.* Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. **Infect Immun.**, v.70: p.672–78, 2002.
- BRANDT, L *et al.* The protective effect of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine is increased by coadministration with the *Mycobacterium tuberculosis* 72-kilodalton fusion polyprotein Mtb72F in M. tuberculosis- infected guinea pigs. **Infect. Immun.** v.72, p.6622-32, 2004.
- BRITTON, W. J. & PALENDIRA, U. Improving vaccines against tuberculosis. **Immunol. Cell Biol.** v.81(1): p.34-45, 2003.
- BROOKES, R. H. *et al.* CD8+ T cell-mediated suppression of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* growth in activated human macrophages. **Eur. J. Immunol.**, v. 33: p. 3293-302, 2003.
- BROWN, M. C. & TAFFET, S. M. Lipoarabinomannans derived from different strains of *Mycobacterium tuberculosis* differentially stimulate the activation of NK-kB and KBF1 in murine macrophages. **Infect. Immun.**, v. 63: p. 1960-68, 1995.
- BUDKER, V *et al.* pH-sensitive, cationic liposomes: a new synthetic vírus-like vetor. **Nature Biotechnol.**, v.14: p.760-64, 1996.

- CLELAND, J.L. Design and production of single-immunization vaccines using polylactide polyglycolide microspheres systems. In: Vaccine Design: the subunit and adjuvant approach, **Plenum Publishing Corporation**, New York, p 949, 1995.
- CLEMENS, D. L. A & HORWITZ, M. A. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. **J. Exp. Med.**, v. 181: p. 2243-47, 1993.
- COELHO, E. A .F, *et al.* *Mycobacterium* hsp65 DNA entrapped into TDM-loaded PLGA microspheres induces protection in mice against *Leishmania (Leishmania) major* infection. **Parasit. Research**. V.98, P.586-75, 2006.
- COLDITZ, G. A. *et al.* Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis : Meta- analysis of the published literature. **JAMA**, v. 271 : p. 698-02, 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.* Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Exp. Med.**, v. 186: p. 39-45, 1997.
- COOPER, A. M. *et al.* Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. **J. Exp. Med.**, v. 178: p. 2243-47, 1993.
- COOPER, A. M. *et al.* Transient loss of resistance to pulmonary tuberculosis in p47(phox^{-/-}) mice. **Infect. Immun.**, v. 68: p. 1231-34, 2000.
- COSMA, C. L. *et al.* Superinfecting micobacteria home to established tuberculous granulomas. **Nat. Immunol.**, v. 5: p. 828-35, 2004.
- D'SOUZA, S *et al.* Improved tuberculosis DNA vaccines by formulation in cationic lipids. **Infect. Immun.**, v.70: p.3681-88, 2002
- DANNENBERG, A.M. Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. **Rev. Infect. Dis.**, v. 28: p. 51-58, 1993.
- DAVID PUTNAM. Polymers for gene delivery across length scales. **Nature Materials**, v. 5 p.439-50, 2006.

- De WAAL MALEFYT *et al.* Interleukin-10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J. Exp. Med.** v.174: p.1209-16, 1991.
- DHEDA K. *et al.* Lung remodeling in pulmonary tuberculosis. **The J. of Infect Dis.** v.192, p.1201-10, 2005.
- DIELI, F. *et al.* Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular *Mycobacterium tuberculosis* by Vgamma9/delta2 T lymphocytes. **J. Exp. Med.**, v. 184: p. 1082-85, 2001
- DOHERT, T.M & SHER, A. Defects in cell mediated immunity affect chronic, but not innate resistance of mice to *Mycobacterium avium* infection. **J. Immunol.** v.158, p.4822-31, 1997.
- DOHERTY, T. M. & ANDERSEN, P. Vaccines for tuberculosis: novel concepts and recent progress. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.18(4): p.687-02, 2005.
- DRENNAN, M. B. *et al.* Toll-like Receptor 2-Deficient mice succumb to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Am. J. Pathol.**, v. 164: p. 49-57, 2004
- DYE, C. *et al.* Consensus statement. Global Burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country. **WHO Global surveillance and Monitoring Project. JAMA**, v. 282: p. 677-86, 1999.
- ELDRIDGE, J.H *et al.* Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. **Molec. Immun.**, v.28: p.287-94, 1991.
- ELIAS D. *et al.* Helminthes could influence the outcome of vaccine against in the tropic. **Parasit. Immunol.**, v. 28 p. 507-13, 2006.
- ERNST, J. D. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, v. 66: p. 1277-81, 1998.
- FELGNER, J.H1 *et al.* Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel of cationic lipid formulations. **J. Biol. Chem.**, v.269: p. 2550-61, 1994.
- FENTON, M.J *et al.* Induction of Gamma Interferon- γ Production in Human Alveolar Macrophages by *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, v.65: p.5149-56, 1997.

- FENTON, M.J. *et al.* Induction of γ interferon production in human alveolar macrophages by *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.** v.65, p.5149-56, 1997.
- FINE, P.E.M.*et al.* Issues relating to the use of BCG immunization programmes. **WHO** Global Surveillance and Monitoring Project, 1999.
- FIORENTINO, D. F. *et al.* IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **J. Immunol.**, v. 146: p. 3444-50, 1991.
- FLYNN, J. L. *et al.* Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **PNAS**, v. 89: p. 12013-17, 1992.
- FLYNN, J.L. *et al.* An essential role for interferon- γ in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J. Exp. Med.**, v.178: p.2249-54, 1993.
- FLYNN, J.L. *et al.* Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **Immunity** v.2, p.561–72, 1995.
- FLYNN, J. L. & CHAN, J. Immunology of Tuberculosis. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 19: p. 93-129, 2001.
- FLYNN, J.L. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. **Tuberculosis**, v. 84: p. 93-01, 2004.
- FLYNN, J. L. & CHAN, J. What's good for the host is good for the bug. **TRENDS Microbiol.**, v. 13(3): p. 98-102, 2005.
- GAO, X. & HUANG, L. Cationic liposome-mediated gene transfer. **Gene Ther.**, v.2: p.710-22, 1995.
- GONÇALVES, E.D.C. Otimização da vacina de DNA-Hsp65 pela estratégia de "prime-boost". **Tese de Doutorado**. FMRP-USP, 2006.
- GOTER-ROBINSON, C. Protection against an aerogenic *Mycobacterium tuberculosis* infection in BCG-immunized and DNA-vaccinated mice is associated with early type I cytokine responses. **Vaccine** v.24 p. 3522-9, 2006.
- GOYAL, P, *et al.* Liposomal drug delivery systems – Clinical applications. **Acta Pharm.**, v.55: p.1–25, 2005

- GREGORIADIS, G. The carrier potential of liposomes in biology and medicine (first of two parts). **New Engl. J. Med.**, v.295: p.704-710, 1976a.
- GREGORIADIS, G. The carrier potential of liposomes in biology and medicine (second of two parts). **New Engl. J. Med.**, v.295: p.765-770, 1976b.
- GREGORIADIS, G. Immunological adjuvants: a role for liposomes. **Immunol. Today**, v.11: p.89-97, 1990.
- GREGORIADIS, G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. **TIBTECH**, v.13: p.527-37, 1995.
- GREGORIADIS, G., *et al.* A role for liposomes in genetic vaccination. **Vaccine**, v.20: p.b1-b9, 2002.
- GREGORIADIS, G. *et al.* Liposome-mediated DNA vaccination. **FEBS letters**, v.402: p.107-10, 1997.
- GRODE, L. *et al.* Efficacious vaccination against tuberculosis by *Mycobacterium bovis* bacilli Calmette-Guérin mutants that secrete listeriolysin. **J. Clin. Invest.**, v. 115: p. 2472-79, 2005.
- GURUNATHAN, S, *et al.* DNA vaccines: immunology, application, and optimization. **Ann. Rev. Immunol.**, v.18: p.927-974, 2000.
- HAN, S.H.; *et al.* DNA Vaccines, Cap.9: p.329-361. *In: Artificial DNA: Methods and Applications.* Editado por Yury E. Khudyakov & Howard A. Fields. CRC Press, 2002.
- HERRMANN, J.L. & LAGRANGE, P.H. 2005. Dendritic cells and Mycobacterium tuberculosis: which is the Trojan horse? **Pathol. Biol.**, v.53: p.35-40.
- HESS, J. & KAUFMANN, S. H. E. Development of novel tuberculosis vaccines. **C. R. Acad. Sci. Paris**, v. 322: p. 953-58, 1999.
- HOLT, J. G. *et al.* The mycobacteria. *In: Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, p. 597-03, 1994.
- HOMER L. Humoral immune defense (antibodies). **Proced. of the Ameri. Thora.** v.2 p.417-21, 2005.

- HORWITZ, M. A. & HARTH, G. A new vaccine against tuberculosis affords greater survival after challenge than the current vaccine in the guinea pig model of pulmonary tuberculosis. **Infect. Immun.** v.71: p.1672–79, 2003.
- HUYGEN, K. *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. **Nat. Med.** v.2, n.8, p.893-98, 1996.
- JIAO, X.; WANG, *et al.* Modulation of cellular immune response against hepatitis C virus nonstructural protein 3 by cationic liposome encapsulated DNA immunization. **Hepatology**, v.37: p.452-60, 2003.
- JOSEPH, A., *et al.* Liposomal immunostimulatory DNA sequence (ISS-ODN): an efficient parenteral and mucosal adjuvant for influenza and hepatitis B vaccines. **Vaccine**, v.20: p. 3342-54, 2002.
- JOUANGUY, E. *et al.* Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guerin infection. **N. Engl. J. Med.** v.335, p.1956–61, 1996.
- JUNG Y. J. *et al.* Increased interleukin-10 is not responsible for failure of T helper 1 immunity to resolve airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection mice. **Immunology**, v.109, p.295-99, 2003.
- JUNQUEIRA-KIPNINS, A.P. *et al.* Interleukin-10 production by lung macrophages in CBA *xid* mutant mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Immunology**, v.115, p.246-52, 2005.
- KAUFMANN, S.H.E & KABELITZ, D. Immunology of infection. **Methods in microbiology**, segunda edição, 2002.
- KAUFMANN, S.H.E. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nature reviews** v.1, p.20-30, 2001.
- KAUFMANN, S. H. E. & 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. 01-05, 2003.
- KAUFMANN, S. H. E. Immune response to tuberculosis: experimental animal models. **Tuberculosis**, v. 83, p. 107-11, 2003.

- KRIEG, A.M. From bugs to drugs: therapeutic immunomodulation with oligodeoxynucleotides containing CpG sequences from bacterial DNA. **Anti. Nucleic Acid Drug Dev.** v.11, p.181-88, 2001.
- KHON, J. *et al.* Single step immunization using controlled biodegradable polymer adjuvant activity. **J. Immunol. Methods.** v.95, p.31-38, 1996.
- LAI, C.K. *et al.* Cytokine gene expression profile of circulating CD4+ T cells in active pulmonary tuberculosis. **Chest** v.111, p.606-11, 1997.
- LEIFERT, J. A. *et al.* Targeting plasmid-encoded proteins to the antigen presentation pathways. **Immunol. Rev.**, v.199: p.40–53, 2004.
- LIMA, K.M., *et al.* Comparison of different delivery systems of vaccination for the induction of protection against tuberculosis in mice. **Vaccine**, v.19: p.3518-25, 2001.
- 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.
- LEWIS, D.H. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In: Chasin M & Langer R. Biodegradable polymers as drug as drug delivery systems. Marcel Dekker, New York, p.1-43, 1990.
- LIU, M.A. DNA vaccines: a review. **Jour. of Internat.I Medic.**, v.253: p.402-10, 2003.
- LOCKHART E *et al.* IL-17 Production Is Dominated by ___ T Cells rather than CD4 T Cells during *Mycobacterium tuberculosis* Infection1. **The Journ. of Immun.**, v.177, p.4662-69, 2006.
- LOWRIE, D.B. *et al.* Towards a DNA vaccine against tuberculosis. **Vaccine**, v.12: p.1537-40, 1994.
- LOWRIE, D. B. *et al.* Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. **Nature** v.400: p.269-71, 1999.
- MARTIN, C. The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG? **Eur Respir J.** v.26: p.162-67, 2005.
- McSHANE, H. *et al.* Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. **Nat. Med.** v.10, p.1240-44, 2004.

- McSHANE, H. *et al.* Enhanced immunogenicity of CD4(+) T-cell responses and protective efficacy of a DNA-modified vaccinia virus Ankara prime-boost vaccination regimen for murine tuberculosis. **Infect. Immun.** v.69, p.681-86, 2001.
- McSHANE, H. *et al.* Enhanced immunogenicity and protective efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* of bacille Calmette- Guerin vaccine using mucosal administration and boosting with a recombinant modified vaccinia virus Ankara. **J. Immunol.** v.171, n.3, p.1602-09, 2003.
- NAU, G.J.; *et al.* A chemoattractant cytokine associated with granulomas intuberculosis and silicosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.94, p.6414-19, 1997.
- NOLTE, F. S. & METCHOCK, B. Mycobacterium. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C. and YOLKEN, F. H. (ed) **Manual of clinical microbiology**, v. 164: p. 3476-79, 2000.
- NORTH, R. J. T cell dependence of macrophage activation and mobilization during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, v.10: p.66-71, 1974.
- NORTH, R.J. Mice incapable of making IL-4 or IL-10 display normal resistance to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin.Exp.Immunol.**v.113, p.55-58, 1998.
- O'DONNELL, M. A. The genetic reconstruction of BCG as a new immunotherapeutic toll. **Trends Microbiol.**, v. 15, p. 512-17, 1997.
- O' HAGAN, *et al.* Long-Term antibody responses in mice following subcutaneousimmunization with ovalbumin entrapped in biodegradeble microparticles. **Vaccine**, v.11, p.965-69, 1993.
- O' HAGAN, D.T, & VALIANTE, N.M. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. **Nature Reviews**, v.2, p. 727-34, 2003.
- O' HAGAN, D. *et al.* Microprticles for delivery of DNA vaccines, **Immun.Reviews**, v.199, p.191-00, 2004.
- OPPMANN, B. *et al.* Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23,with biological activities similar as well as distinct from IL-12. **Immunity** v.13, p.715-25, 2000.

- ORME, I. M. Induction of nonspecific acquired resistance and delayed-type hypersensitivity, but not specific acquired resistance in mice inoculated with killed mycobacterial vaccines. **Infect. Immun.**, v.56, p.3310-12, 1988.
- ORME, I. M. *et al.* T lymphocytes mediating protection and cellular cytolysis during the course of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Evidence for different kinetics and recognition of a wide spectrum of protein antigens. **J. Immunol.**, v. 148, p. 189-96, 1992.
- ORME, I. M. The mouse as a useful model of tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 83, p. 112-15, 2003.
- ORME, I. M. Preclinical testing of new vaccines for tuberculosis: A comprehensive review. **Vaccine** v.24, p. 2-19, 2006
- PLOTKIN S A. Vaccines: past, present and future. **Nature Medicine**, v.11, p.5-11, 2005
- PERRIE, Y & GREGORIADIS, G. Liposome-entrapped plasmid DNA: characterisation studies. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1475: p.125-32, 2000.
- PUNTNAM, D. Polymers for gene delivery across length scales. **Nature Materials**, v.5, p.439-50, 2006.
- REED, S. & LOBET, Y. Tuberculosis vaccine development: from mouse to man. **Microbes and Infect.**, v. 7: p. 922-31, 2005.
- REED, S. G. *et al.* Prospects for a better vaccine against tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 83(1-3): p.213-19, 2003.
- REMY, J.S. *et al.* Gene-transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules. **Bioconj. Chem.**, v.5: p.647-54, 1994.
- RIEDER, H.L. Epidemiology of tuberculosis in Europe. **Europ. Resp. J.** v.8, n.20, p.620s-632s, 2005.
- ROSADA, R.S. Vacina de DNA pVAX-Hsp65 contra a tuberculose experimental, veiculada por diferentes construções lipossomais, apresenta proteção dependente da dose e rota de administração. **Dissertação de Mestrado**. FMRP-USP, 2006.

- ROJAS, R. E. *et al.* Regulation of human CD4+ $\alpha\beta$ T-cell-receptor positive (TCR+) and $\gamma\delta$ TCR+ T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* by IL-10 and transforming growth factor β . **Infect. Immun.**, v. 67: p. 6461-67, 1999.
- ROOK, G. A. *et al.* Do successful tuberculosis vaccines need to be immunoregulatory rather than merely Th1-boosteing? **Vaccine**, v. 23: p. 2115-20, 2005.
- ROOK, G.*et al.* Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5: p. 661-67, 2005b.
- ROSENZWEIG, H.S *et al.* O-alkyl dioleoyl phosphatidylcholinium compounds: the effect of varying alkyl chain length on their physical properties and in vitro DNA transfection agents. **Bioconj. Chem.**, v.11: p.306-13, 2000.
- ROSENZWEIG, H.S.*et al.* Diquaternary ammonium compounds as transfection agents. **Bioconj. Chem.**, v.12: p.258-263, 2001.
- RUBERTI, M. *et al.* Prime-boost vaccination based on DNA and protein-loaded microspheres for tuberculosis prevention. **J. Drug Target** v.12, n.4, p.195-03, 2004.
- RYLEY, R. L. *et al.* Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis. A two-year study of contagion in a tuberculosis ward. **Amer. J. Hyg.**, v. 70: p. 185-96, 1959.
- SALGAME, P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Curr. Opin. Immunol.**, v.17: p.374-80, 2005.
- SANTOS, S.A. Desenvolvimento de vacinas de subunidades baseadas na proteína Hsp65 e adjuvantes formulados em microesferas; Avaliação da imunogenicidade e proteção contra tuberculose experimental. **Tese de Doutorado**. FMRP-USP. Imunologia Básica e Aplicada. Ribeirão Preto, 2006.
- SANTOS-JÚNIOR, R.R. Immunomodulation and protection induced by DNA-hsp65 vaccination in an animal model of arthritis.**Hum Gene Ther**, v.16 p.:1338-45, 2005.
- SERBINA, N.V. *et al.* Early emergence of CD8+ T cells primed for production of type 1 cytokines in the lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. **Infect. Immun.** v.67, p.3980-88, 1999.

- SERBINA, N. V. *et al.* CD8+ CTL from lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice express perforin in vivo and lyse infected macrophages. **J. Immunol.**, v. 165: p. 353-63, 2000.
- SILVA, C. L. *et al.* Characterization of the memory/activated T cells that mediate the long-lived host response against tuberculosis after bacillus Calmette-Guérin or DNA vaccination. **Immunol.**, v.97: p.573-81, 1999.
- SILVA, C.L. *et al.* Immunotherapy with plasmid DNA encoding mycobacterial hsp65 in association with chemotherapy is a more rapid and efficient form of treatment for tuberculosis in mice. **Gene Therapy**, v.12: p.281-87, 2005.
- SILVA, C. L. *et al.* Cytotoxic T cells and mycobacteria. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 197: p. 11-18, 2001.
- SILVA, C.L. *et al.* Characterization of the T cells that confer a high degree of protective immunity against tuberculosis in mice after vaccination with tumour cells expressing mycobacterial hsp65. **Infect. Immun.**, v.64, p.2400-07, 1996.
- SILVA, C.L.. *et al.* Cytotoxic T cells and mycobacteria. **FEMS Microbiol. Lett.** v.197, p.11-18, 2001.
- SIMMONS. M. *et al.* Characterization of antibody responses to combinations of a dengue virus type 2 DNA vaccine and two dengue virus type 2 protein vaccines in rhesus macaques. **J Virol.** v.80, p.9577-85, 2006
- SKEIKY, Y.A. *et al.* Differential immune responses and protective efficacy induced by components of tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. **J. Immunol.** v.172, p.7618-28, 2004.
- SMITH, D. W. Protective effect of BCG in experimental tuberculosis. **Adv. Tuberc. Res.**, v.2, p.91-97, 1985.
- SOARES L.M. Avaliação da Vacina DNA-hsp65 na Indução de Auto-Agressão Tecidual. **Dissertação de Mestrado.** FMRP-USP. Imunologia Básica e Aplicada. Ribeirão Preto, 2006.
- STENGER, S. *et al.* An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. **Science**, v. 282: p. 121-25, 1998.

- STENGER S & MODLIN R.I. T cell immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Current. Opinion in Microb*, v.2, p.89-83, 1999.
- SUGAWARA, I. *et al.* Role of interleukin-18 (IL-18) in mycobacterial infection in IL-18-gene-disrupted mice. *Infect. Immun.* v.67, p.2585–9, 1999.
- VAN KOOYK, Y.& GEIJTENBEEK, T.B. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat. Rev. Immunol.*, v.3., p.697-09, 2003.
- VONREYN, C. F & VUOLA, J. M. New vaccines for the prevention of tuberculosis. *Vaccine*, v. 33, p. 465-74, 2002.
- WAECKERLE-MEN *et al.* PLGA microspheres for improved antigen delivery to dendritic cells as cellular vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews* v.57, p.475–82, 2005.
- WANG, R. *et al.* Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in human by a malaria DNA vaccine. *Science*, v.282: p.476-80 1998.
- WHO. Global Tuberculosis Control: Surveillance., Planing, Financing.
- WONG, J.P.; *et al.* DNA vaccination against respiratory influenza virus infection. *Vaccine*, v.19: p.2461-67, 2001.
- YOUNG, D.B & STEWART, G.R. Tuberculosis vaccines. *Br. Med Bull.* v.62, p.73-86, 2002.
- ZHANG, Y.; *et al.* Immunogenicity of plasmid DNA encoding the 62 kDa fragment of *Schistosoma japonicum* myosin. *Vaccine*, v.18: p.2102-09, 2000.
- ZHDANOV, R.I, *et al.* Cationic lipid- DNA complexes -lipoplexes - for gene transfer and therapy. *Bioelectrochemistry*, v.58: p.53-64, 2002.
- ZHU, D.; JIANG, S. & LUO, X. Therapeutic effects of Ag85B and MPT64 DNA vaccines in a murine model of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Vaccine*, v. 23: p. 4619-24, 2005.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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