

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

**SANDRA APARECIDA DOS SANTOS**

**Desenvolvimento de vacinas de subunidade baseadas na proteína Hsp65 e adjuvantes formulados em microesferas: avaliação da imunogenicidade e proteção contra tuberculose experimental**

**Ribeirão Preto  
-2006-**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

## ABREVIATURAS

A/O	Emulsão água em óleo
A/O/A	Emulsão água em óleo em água
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
APC	Célula apresentadora de antígeno
BAAR	Bacilo álcool ácido resistente
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BCR	Receptor de antígeno em célula B
BSA	Soro albumina bovina
CAMP	Peptídeo catiônico com propriedade antimicrobiana
CFP	Proteínas do filtrado de cultura
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMV	Citomegalovirus
Con A	Concanavalina A
CpG	Dinucleotídios citosina-guanina, seqüências CG imunomodulatórias
CR3	Receptor da proteína C3 da cascata do complemento
CWS	Esqueleto da parede celular bacteriana
DMT	Dimicolato de trealose
DNA-Hsp65	Vacina de DNA que codifica a proteína Hsp65 de <i>Mycobacterium leprae</i>
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FDA	Food and Drug Administration
FIA	Adjuvante incompleto de Freund
H37Rv	Cepa virulenta de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> isolada de material humano
HIV	Virus da imunodeficiência humana
Hsp65	Proteína do choque térmico de 65kDa de <i>M. leprae</i>
HSV	Virus do herpes simples
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
iNOS	Sintase induzível do óxido nítrico
IPTG	Isopropiltio- $\beta$ -D-Galactosídeo
J774	Macrófagos de linhagem tumoral originários de camundongos BALB/c
KLK	Seqüência polipeptídica KLKLLLLLKLK sintética de uma defensina de inseto

LAL	Lisado de amebócito de <i>Limulus sp</i>
LAM	Lipoarabinomanana
LPS	Lipopolissacarídeo
MAC	Micobactéria do complexo avium
MDR	Multidroga resistente
MHC	Moléculas do complexo principal de histocompatibilidade
MRSA	Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
MPL	Monofosforil lipídeo A
NK	Célula <i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
ODN	Oligodesoxinucleotídeos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Solução salina tamponada
PGL-I	Glicolipídeo fenólico I
PLA	Polímero derivado do ácido láctico
PLGA	Co-polímero derivado dos ácidos poli-láctico e glicólico
PPD	Derivado protéico purificado da tuberculina
RM	Receptor de manose
RNAm	RNA mensageiro
ROI	Intermediário reativo do oxigênio
SBF	Soro bovino fetal
SCID	Imunodeficiência grave combinada
TB	Tuberculose
TCR	Receptor de antígeno em célula T
TGF- $\beta$	Fator beta de transformação e crescimento
Th1	Célula T auxiliar tipo 1
Th2	Célula T auxiliar tipo 2
TLR	Receptor tipo <i>Toll</i>
TNF- $\alpha$	Fator alfa de necrose tumoral
UFC	Unidade formadora de colônia

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 – Tuberculose	2
1.2 – Resposta Imune na tuberculose	3
1.2.1- Resposta imune inata	4
1.2.2 - Resposta imune adaptativa	6
1.3- Vacinação	10
1.4– Adjuvantes	13
1.5- Vacinas contra tuberculose	16
1.5.1 - Vacina de uso corrente contra TB: BCG	16
1.5.2 - Vacinas de primeira geração	17
1.5.3 - Vacinas de segunda geração	18
1.5.4 - Vacinas de terceira geração	19
1.5.5- Desenvolvimento da vacina baseada no antígeno Hsp65	19
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>29</b>
3.1- Obtenção da proteína Hsp65 recombinante	30
3.1.1- Protocolo 1: Hsp65a	30
3.1.2 - Protocolo 2: Hsp65b	30
3.2 - Doseamento e caracterização da proteína recombinante	31
3.3 - Encapsulamento da proteína e adjuvantes em microesferas	31
3.4 - Avaliação da eficiência do encapsulamento da proteína recombinante em microesferas	32
3.5 - Determinação da distribuição de diâmetro das microesferas	32
3.6 - Ensaio de liberação <i>in vitro</i>	32
3.7 - Animais	32
3.8 - Imunizações	33
3.8.1 - Imunizações com a proteína Hsp65 encapsulada em microesferas	33
3.8.2 - Delineamento dos grupos experimentais	33
3.9 - Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem de anticorpos	34
3.10 - Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção das citocinas	34
3.11 - Avaliação da expressão de marcadores de superfície por citometria de fluxo	35
3.12 - Determinação da viabilidade das cepas micobacterianas	35
3.13 - Infecção desafio com <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	36
3.14 - Determinação do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)	36
3.15 – Análise histopatológica do pulmão	36
3.16 – Estudo da migração celular: bolha de ar	36
3.17- Análise estatística	37
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>38</b>
4.1 – Obtenção da proteína Hsp65 recombinante para o preparo das formulações vacinais	39
4.1.1 –Purificação da Hsp65 recombinante (Hsp65a) e remoção do LPS pela técnica de separação de fases com Triton X-114	39
4.1.2 – Resposta imune induzida após a vacinação com formulações contendo Hsp65a tratada com Triton X-114	40
4.1.3 –Obtenção da Hsp65 recombinante (Hsp65b): clonagem do gene da Hsp65 de <i>M. leprae</i> no vetor pET28a , expressão e purificação da proteína recombinante	42
4.1.4 – Comparação das respostas às proteínas rHsp65a e rHsp65b utilizadas em ELISA para detecção de anticorpos e como estímulo para culturas “ <i>in vitro</i> ”	45
4.2 - Formulação de vacinas contendo Hsp65a ou Hsp65b e adjuvantes encapsulados em microesferas biodegradáveis: caracterização das formulações e estudo da imunogenicidade	47
4.2.1- Caracterização das formulações vacinais	47
4.2.2 - Resposta imune humoral induzida após a vacinação	53
4.2.3 – Resposta imune celular induzida após a vacinação	57
4.2.4 – Expressão de moléculas de superfície celular	61

4.2.5 – Resposta imune humoral nos animais imunizados e infectados _____	64
4.2.6 – Resposta imune celular _____	67
4.2.7 – Expressão de marcadores de superfície celular: animais imunizados e infectados _____	71
4.2.8 – Ensaio de proteção _____	74
4.2.9 – Análise histopatológica de cortes do pulmão dos animais infectados por <i>M. tuberculosis</i> _____	77
4.3 – Eventos imunológicos iniciais desencadeados pela administração das formulações vacinais _____	89
<b>5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES _____</b>	<b>93</b>
<b>6. RESUMO _____</b>	<b>107</b>
<b>7. ABSTRACT _____</b>	<b>109</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____</b>	<b>111</b>
<b>9. APÊNDICES _____</b>	<b>125</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1 – Tuberculose**

Mais de 100 anos se passaram após a descoberta por Koch (1882) do agente causador da tuberculose (TB), o *Mycobacterium tuberculosis*. Esse único microorganismo continua sendo um dos maiores causadores de morte no mundo. No passado a TB foi disseminada pelos fluxos migratórios e em decorrência das guerras. Após a introdução da vacina contra TB [Bacilo de Calmette-Guérin (BCG)] e da descoberta de fármacos para o tratamento da tuberculose, a disseminação da doença pôde ser melhor controlada. Entretanto, apesar desses grandes avanços, a TB permanece como um dos principais desafios à saúde pública em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento. Nos tempos atuais, atingiu 10 milhões de novos casos e 3 milhões de mortes por ano, sendo 18,5% de todas as mortes em adultos entre 15-59 anos - a fase mais produtiva da população mundial. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2004), cerca de 32% da população mundial está infectada pelo *M. tuberculosis*. Na década passada, 1990-1999, em torno de 300 milhões de pessoas foram infectadas surgindo 90 milhões de novos casos da doença dentre os quais 30 milhões evoluíram a óbito. Muito mais pessoas morreram de TB em 1996 do que em qualquer ano da história (DYE *et al*, 1999).

A re-emergência da tuberculose pode ser atribuída a fatores como: (I) o declínio nas condições de vida de parcela considerável da população mundial; (II) o declínio dos recursos destinados às ações de controle da doença nos países em desenvolvimento; (III) problemas gerais de ordem política e organizacional, enfrentados pelos sistemas públicos de saúde em todo o mundo; (IV) o crescimento dos fluxos migratórios; (V) epidemia de AIDS; (VI) os problemas ligados à dificuldade de adesão de parcela dos pacientes aos esquemas terapêuticos que, embora atualmente encurtados, ainda exigem um tempo relativamente longo e com efeitos adversos consideráveis; e (VII) o surgimento de cepas de micobactérias resistentes a um ou mais fármacos utilizados na quimioterapia da doença (BLOOM & MURRAY, 1992; BRUDNEY & DOBKIN, 1991; RIEDER, 1995).

Visto que os programas e estratégias de controle da TB não estão sendo efetivos, a descoberta de novos fármacos e a otimização de esquemas preventivos e terapêuticos é imprescindível. Além disso, a variabilidade na proteção conferida pela vacina de uso corrente, a BCG, justifica o desenvolvimento e introdução de novas vacinas profiláticas e terapêuticas para o combate a TB.

## **1.2 – Resposta Imune na tuberculose**

*M. tuberculosis*, o agente etiológico da TB, é um patógeno intracelular aeróbico obrigatório e apresenta uma parede celular rica em ácidos graxos de cadeia longa e glicolipídeos entre outros componentes. Esta estrutura contribui para a sua sobrevivência dentro da célula do hospedeiro, normalmente o macrófago alveolar ou células dendríticas residentes no pulmão (GONZALEZ-JUARRERO & ORME, 2001). Esse patógeno tem crescimento lento e por esse motivo o diagnóstico microbiológico da doença também é demorado. Além disso, a natureza crônica da infecção justifica a necessidade de tratamento quimioterápico de longa duração (Revisto por KAUFMANN, 2001).

A transmissão de *M. tuberculosis* acontece pela via respiratória e, embora possa ocorrer em outras partes do corpo humano (ossos, rins, pleura, gânglios, intestino, cérebro, etc), a tuberculose pulmonar é a forma mais comum da doença (FLYNN & CHAN, 2001a). A infecção por *M. tuberculosis* normalmente se inicia na superfície da mucosa pulmonar quando os bacilos inalados encontram os macrófagos alveolares. Os bacilos estão presentes em gotículas liberadas por indivíduos com a doença ativa durante a tosse. O estabelecimento da infecção 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). A resposta imune desencadeada após o contato com esse patógeno é eficiente em impedir a infecção de modo que menos de 10% dos indivíduos que entram em contato com o bacilo desenvolvem a tuberculose primária ou doença ativa e podem transmitir a doença para outros indivíduos (YOUNG & STEWART, 2002; WHO, 2004). Já outra parcela dos indivíduos infectados permanece assintomática e não transmite a infecção, isso porque apesar do controle da infecção os bacilos não são eliminados (Revisto por PARRISH *et al*, 1998). Os indivíduos assintomáticos ou portadores da tuberculose latente podem permanecer por um longo período de tempo nessa condição ou até a vida toda. Entretanto, se o sistema imune se torna imunossuprimido como, por exemplo, após a infecção por HIV, após o uso prolongado de corticosteróides, durante o envelhecimento ou o abuso de drogas e do álcool, a doença pode ser reativada (FLYNN & CHAN, 2001b).

A resposta imune desencadeada na tuberculose é bastante complexa e envolve muitos componentes do sistema imune que, paradoxalmente, podem atuar tanto na proteção quanto na imunopatologia da doença. Assim, a compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta imune protetora ou patológica é essencial para o desenvolvimento racional de vacinas profiláticas e/ou terapêuticas contra a TB. Além disso, esse entendimento é importante para a

escolha de marcadores imunológicos que possam ser correlacionados à proteção contra a doença, servindo como uma ferramenta na escolha de novos candidatos a vacinas.

### ***1.2.1- Resposta imune inata***

O estabelecimento ou eliminação da infecção por *M. tuberculosis* depende da interação inicial do bacilo com a célula hospedeira, usualmente o macrófago alveolar. Essa interação inicial desencadeia a liberação de uma cascata de moléculas inflamatórias, incluindo citocinas e quimiocinas, que além de participarem no recrutamento celular também terão papel fundamental no estabelecimento da resposta imune contra o bacilo da TB. Os macrófagos são células capazes de reconhecer, fagocitar e, ainda, eliminar os patógenos com os quais entram em contato (SCHLESINGER, 1993). A etapa de reconhecimento do patógeno é mediada pela interação do bacilo com moléculas que reconhecem estruturas conservadas entre os microorganismos, conhecidas como padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). Os receptores para o sistema complemento (CR1, CR2, CR3 e CR4) e os receptores de manose (RM) entre outras moléculas como os receptores “toll-like” (TLR), expressos na superfície celular, desempenham importante papel na etapa que precede a fagocitose, o reconhecimento (KANG & SCHLESINGER, 1998; HIRSCH *et al*, 1994; SCHLESINGER, 1996; UNDERHILL *et al*, 1999). Após a fagocitose e entrada do bacilo na célula hospedeira, os mecanismos microbicidas serão desencadeados por meio (1) da liberação de enzimas lisossomais durante a fusão do fagossoma ao lisossoma, (2) da geração de intermediários reativos do oxigênio (ROIs) tóxicos para os bacilos, (3) da produção de reativos intermediários do nitrogênio (RNIs) (CHAN & FLYNN, 1999), (4) pela produção de citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (DENNIS, 1991) ou (5) pela apoptose da célula infectada (ADAMS & HAMILTON, 1992). Os ROIs desempenham importante função no controle da infecção na sua fase inicial (WALKER & LOWRIE, 1981) e o seu aparecimento precede os mecanismos microbicidas desencadeados pela produção de óxido nítrico (NO) e acidificação do fagossoma no macrófago ativado. Já o papel dos RNIs é controverso. Alguns autores (CHAN *et al*, 1995) demonstraram que eles têm importante função no controle da infecção por *M. tuberculosis* em camundongos, enquanto outros estudos sugerem que possam exacerbar a infecção (GARNES *et al*, 1999). IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  agem de forma sinérgica e o seu principal efeito é a indução da produção de RNIs (DING *et al*, 1988) e a expressão de quimiocinas, bem como de seus receptores. Um outro mecanismo microbicida potencial envolvido na defesa do macrófago contra o *M. tuberculosis* é a apoptose ou morte programada da célula infectada. Alguns trabalhos mostram que a infecção, geralmente, promove apoptose do

macrófago infectado e, em alguns casos, também acontece a diminuição da viabilidade da micobactéria (ODDO *et al*, 1998; FARBAIRN, 2004). Além disso, trabalhos mais recentes mostram que por meio da apoptose células T CD8 podem ser estimuladas por apresentação cruzada (SCHAIBLE *et al*, 2003). A ativação desse tipo celular é importante tanto para a eliminação de células infectadas quanto do próprio bacilo, o papel dessas células será discutido mais adiante. Entretanto, o efeito na viabilidade de *M. tuberculosis* mediado pela apoptose de macrófagos via Fas-L ou TNF- $\alpha$  em camundongos ainda é controverso; alguns estudos mostram que há uma redução no número de bactérias após a apoptose da célula infectada (CONDOS *et al*, 1997) e outros indicam que esse mecanismo tem pouco efeito antimicobacteriano (TAN *et al*, 1997). Por outro lado, existem trabalhos que sugerem que a infecção previne a apoptose e aumenta a viabilidade celular (KREMER *et al*, 1997).

Além de macrófagos, outras células, como os neutrófilos e células NK também desempenham importante papel na resposta imune contra o *M. tuberculosis*. Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o sítio de replicação do bacilo. Em seguida, migram as células NK e as células da imunidade adaptativa. Alguns trabalhos mostraram que a capacidade de fagocitose de neutrófilos é aumentada na presença de GM-CSF e que neutrófilos humanos dispõem de mecanismos microbicidas, ausentes em macrófagos, como as defensinas, capazes de eliminar os bacilos (FLEISCHMANN *et al*, 1986; MAJEED *et al*, 1998; OGATA *et al*, 1992). As células NK parecem atuar diretamente na lise dos bacilos e de células infectadas (Esin *et al*, 1996), ou indiretamente por meio da produção de citocinas capazes de ativar macrófagos (BERMUDEZ & YOUNG, 1991; MOLLOY *et al*, 1993). Alguns estudos têm correlacionado a redução no número dessas células com a infecção por bacilos resistentes a múltiplas drogas (MDR) (RATCLIFFE *et al*, 1994).

Entretanto, os bacilos são altamente adaptados ao homem e ao infectá-lo são capazes de escapar dos mecanismos iniciais de defesa desencadeados pelo hospedeiro. Algumas dessas estratégias de escape estão relacionadas ao metabolismo oxidativo. A interação preferencial via receptores como o CR3, por exemplo, impede o “burst” oxidativo, diminuindo a produção de ROIs e evitando a ação tóxica dos mesmos sob o *M. tuberculosis* (WRIGHT *et al*, 1983). Além disso, enzimas como a catalase e superóxido dismutase produzidas pelas micobactérias são capazes de degradar espécies reativas do oxigênio (COLE *et al*, 1998; ROBERTS & HIRST, 1996). O bacilo da tuberculose também é capaz de sobreviver no interior de macrófagos evitando o seu processamento no fagolisossoma por impedir a formação do mesmo (Revisto por RUSSEL, 1995; TURNER & DOCKREL, 1996). Assim, alguns dos mecanismos de escape são atribuídos, há décadas, à interação preferencial

do bacilo com alguns dos receptores em macrófagos (ARMSTRONG & HART, 1975) e à presença de determinados glicolipídios da superfície micobacteriana, como o dimicolato de trealose (DMT) (CLEMENS & HORWITZ, 1995). Outra forma de inibir a fusão do fagossoma ao lisossoma é a produção de amônia pelo patógeno (GORDON *et al*, 1980). Componentes da parede celular do bacilo, como a lipoarabinomanana (LAM), o glicolípido fenólico (PGL-I) e as proteínas de estresse, como a Hsp65, também atuam na desativação dos macrófagos. LAM e PGL-I, além de inibirem a ação dos ROIs (CHAN *et al*, 1991), diminuem a produção de citocinas inflamatórias (SILVA *et al*, 1993) e induzem a liberação de citocinas como o TGF- $\beta$  e IL-10 (BERMUDEZ, 1993), que podem atuar como supressores da resposta imune. Além disso, os bacilos submetidos às condições variadas de estresse no interior dos macrófagos, como sua própria entrada na célula do hospedeiro, liberam altas concentrações de Hsp65 e podem induzir a liberação de TNF- $\alpha$  e de TGF- $\beta$ ; aumentar a transcrição de RNAm para as citocinas IL-1, IL-10 e TNF- $\alpha$ ; diminuir a transcrição de RNAm para a enzima sintase induzível do óxido nítrico (iNOS) e, conseqüentemente, a síntese de RNIs como óxido nítrico (NO) (LIMA, 1996).

### ***1.2.2 - Resposta imune adaptativa***

Além de participar dos eventos iniciais da resposta contra a micobactéria, os macrófagos também participam, juntamente com outras células apresentadoras de antígenos (células dendríticas), da resposta imune adaptativa ou específica. Evidências recentes sugerem que a expressão do receptor de quimiocina CCR2 é necessária durante o recrutamento de macrófagos e células dendríticas da periferia para os pulmões (PETERS *et al*, 2004). Essas células processam e apresentam antígenos resultantes da degradação do bacilo fagocitado para os linfócitos (TAN *et al*, 1997). A expressão dos receptores CCR7 (BHATT *et al*, 2004) e CCR5 (ALGOOD & FLYNN, 2004) por sua vez permitem que as células dendríticas que carregam os antígenos micobacterianos migrem do pulmão para os linfonodos drenantes onde é iniciada a resposta imune específica. A apresentação desses antígenos para os linfócitos T desencadeia uma série de eventos (proliferação, diferenciação e ativação celular) que levarão ao estabelecimento da resposta imune específica. Esta resposta é muito importante para limitar o crescimento e eliminar o bacilo.

A resistência contra TB é dependente, predominantemente, da imunidade específica mediada por células. Por se tratar de um patógeno intracelular a resposta imune humoral tem um papel secundário no controle dessa infecção. Assim, os mecanismos efetores de células T mais do que anticorpos são requeridos para controlar ou eliminar a bactéria. A importância de

células T foi ilustrada por Doherty e Sher (1997), quando mostraram aumento da susceptibilidade à infecção por *M. 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. A importância de linfócitos T CD4 na imunidade contra TB humana foi evidenciada em pacientes infectados por HIV, onde a depleção dessas células foi correlacionada com a maior susceptibilidade a essa doença (LAI *et al*, 1997). Sua importância na resposta protetora está relacionada ao desenvolvimento da resposta de perfil Th1, ou seja, desenvolvida num microambiente em que prevalecem as citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-2 e TNF- $\alpha$ . O IFN- $\gamma$  é de fundamental importância na resposta contra *M. tuberculosis* e é produzido por células T CD4, T CD8, NK e pelo próprio macrófago infectado (FENTON *et al*, 1997). Pacientes que apresentam deficiências nos receptores para o IFN- $\gamma$  são mais susceptíveis às infecções micobacterianas (JOUANGUY *et al*, 1997). Um dos principais papéis atribuídos ao IFN- $\gamma$  e outras citocinas do padrão Th1 na resposta do hospedeiro contra TB consiste na ativação e recrutamento de macrófagos. Vários pesquisadores mostraram que o IFN- $\gamma$  é uma das principais citocinas associadas à resposta protetora durante a infecção por micobactérias (COOPER, 1993; FLYNN, 1993; YANG & MITSUYAMA, 1997). Os macrófagos ativados por essa citocina são capazes de controlar a infecção micobacteriana (BONECINI-ALMEIDA *et al*, 1998; SATO *et al*, 1998). Além disso, Zhang e colaboradores (1994) mostraram que a secreção de IL-12 por macrófagos pleurais humanos é também importante. Essa citocina induz a ativação de células NK, estimulando-as a produzirem IFN- $\gamma$  (D' ANDREA *et al*, 1992) ou aumentando sua capacidade citotóxica direta sobre células infectadas e, além disso, estimulando a diferenciação de linfócitos T CD4 para o padrão Th1 (Revisto por TRINCHIERI, 1997). Dessa forma, células T CD4 produtoras de IFN- $\gamma$  seriam capazes de ativar macrófagos que, conseqüentemente, atuariam na destruição dos bacilos ou, pelo menos na inibição da multiplicação de bactérias remanescentes. Além das células CD4 e macrófagos, um importante papel na resposta protetora contra TB também tem sido atribuído às células T CD8 citotóxicas. A maioria dessas células medeia a lise de células infectadas por meio da formação de poros por perforina e pela ação das moléculas efetoras, granulinas e granzimas (Revisto por SILVA *et al*, 2001). Tem sido descrito ainda, que células T CD8 de camundongos infectados produzem IFN- $\gamma$  em resposta ao reconhecimento de antígenos de *M. tuberculosis* apresentados por células dendríticas ou macrófagos (SERBINA & FLYNN, 1999). Além disso, a cultura de linfócitos provenientes de pulmão de animais infectados na presença de células dendríticas também infectadas é capaz de gerar células T CD8 que

reconhecem e lisam macrófagos infectados por *M. tuberculosis* (SERBINA *et al*, 2000). Células T CD8 de indivíduos reativos para o teste de hipersensibilidade cutânea ao PPD podem ser expandidas *in vitro* pela cultura com macrófagos infectados por *M. tuberculosis* ou BCG (SMITH *et al*, 1999). Ou seja, estas células são capazes de proliferar em resposta à bactéria viva ou a antígenos micobacterianos, exercer sua função citotóxica e também produzir IFN- $\gamma$ . Esses dados mostram que células T CD8, restritas ao reconhecimento de antígenos associados às moléculas de classe I do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), também participam do controle da TB (Revisto por SILVA *et al*, 2001).

Além de células T que expressam os receptores  $\alpha\beta$  (CD4 ou CD8), existem aquelas que expressam os receptores  $\gamma\delta$ . Estas últimas compreendem cerca de 1-5% dos linfócitos T circulantes do sangue. Funcionalmente, se assemelham às células T  $\alpha\beta$ , secretam diferentes citocinas como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e podem exercer atividade citotóxica contra macrófagos infectados reduzindo a viabilidade de bacilos extra ou intracelulares e por isso têm sido associadas a imunidade protetora (BOOM, 1999; DIELI *et al*, 2001; THOMA-USZYNSKI *et al*, 2000; TSUKAGUCHI *et al*, 1995). Embora alguns trabalhos tenham mostrado que há aumento na população de células T  $\gamma\delta$  em pacientes com TB (ITO *et al*, 1992; UETA *et al*, 1994), outros grupos mostraram que não há variação nessa população celular (BARNES *et al*, 1992; LI *et al*, 1996; TAZI *et al*, 1992).

As células T com especificidade para glicolípídeos apresentados por moléculas CD1 também parecem ter função na tuberculose humana. O grupo CD1 normalmente apresenta glicolípídeos que são abundantes na parede micobacteriana, como fosfatidil inositol, manosídeos, lipoarabinomanana e ácidos micólicos. As moléculas CD1a, CD1b e CD1c são encontradas em primatas, cobaias mas não em camundongos e, geralmente, as células T que reconhecem esses lipídeos apresentados via CD1 produzem IFN- $\gamma$  e também podem exercer atividade citotóxica (Revisto por KAUFMANN, 2001).

Os bacilos da TB, que persistem no hospedeiro, normalmente permanecem dentro dos macrófagos, que se localizam em uma estrutura celular complexa conhecida como granuloma. Os granulomas se formam durante a reação inflamatória crônica (BEAN *et al*, 1999; NAU *et al*, 1997), e são capazes de limitar o crescimento da micobactéria e prevenir a disseminação da infecção para outros órgãos. Esta estrutura consiste num aglomerado de macrófagos rodeados por linfócitos e fibroblastos. 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. 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- $\gamma$  (JOUANGUY *et al*, 1996) e TNF- $\alpha$  (FLYNN *et al*, 1995). O granuloma é uma estrutura dinâmica onde macrófagos e linfócitos morrem e são repostos por novas células constantemente.

Em 2003, Algood e colaboradores propuseram um modelo para a formação e manutenção do granuloma no pulmão de um indivíduo infectado onde o TNF- $\alpha$  e quimiocinas desempenham papéis fundamentais. Assim nesse modelo propõe-se que, após a captura de bacilos por macrófagos alveolares ou do parênquima, o TNF- $\alpha$  é produzido e induz a expressão de quimiocinas por essas células (e talvez outras células) no sítio da infecção. As quimiocinas produzidas criam um gradiente quimiotático que direciona a migração das células que entraram no pulmão para o sítio onde estão os macrófagos infectados. As células T que chegam nesse sítio são células ativadas, expressam os receptores CXCR3 e CCR5 e também podem responder as citocinas induzidas por TNF- $\alpha$ . Os monócitos e macrófagos (expressando CCR2 e CCR5) recrutados para o sítio de infecção aumentam a produção de quimiocinas e com isso também aumentam o recrutamento de células que formarão o granuloma. Citocinas produzidas por células T recrutadas para o sítio também poderiam aumentar a produção de quimiocinas incluindo aquelas induzidas por IFN- $\gamma$  (CXCL9 e CXCL10). Com o controle da infecção, a redução no número de bactérias e a menor produção de TNF- $\alpha$ , a expressão de quimiocinas é reduzida e, conseqüentemente, diminui o influxo de células e o tamanho do granuloma. Nesse modelo ainda se propõe que distúrbios no balanço de TNF- $\alpha$  e quimiocinas levam ao controle inicial inadequado da infecção, reativação da infecção latente e, provavelmente, a disseminação da infecção. Existem importantes evidências de que a manutenção do ambiente imunológico no granuloma é essencial para a prevenção da reativação de bacilos dormentes. Entretanto a exata natureza das respostas imunológicas que norteiam a reativação da infecção latente ainda não foi completamente esclarecida (Revisto por SALGAME, 2005).

Nas infecções latentes, o estado da bactéria dentro do granuloma não é bem conhecido. Acredita-se que o bacilo deva estar em um estado dormente e não replicante, ou, ativamente replicante mas controlado pelo sistema imune, ou ainda, metabolicamente alterado e com ciclos de replicação limitados ou não freqüentes. Quando a resposta imune designada a conter a infecção acontece de forma exacerbada, a reativação e a replicação do bacilo podem ser desencadeadas promovendo necrose e dano tecidual no pulmão (Revisto por FLYNN & CHAN, 2001a). Desta forma, é possível visualizar um limite muito tênue entre a resposta

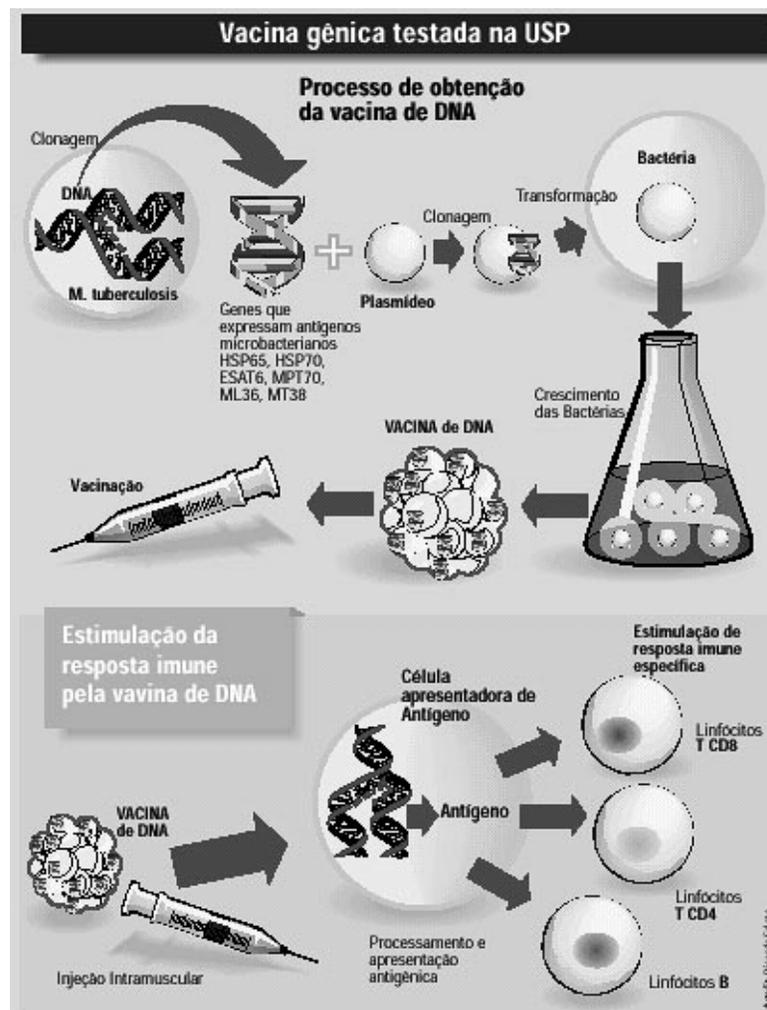
imune protetora contra TB e o dano tecidual causado por ela. Nesse sentido, uma nova discussão sobre os mecanismos envolvidos na resposta imune desencadeada na TB pode contribuir para o entendimento do binômio proteção/dano tecidual e, além disso, abre perspectivas para o desenvolvimento de novas vacinas. Apesar da grande maioria dos trabalhos sobre proteção contra TB ressaltar apenas a importância da indução de respostas imunes do tipo Th1, tem-se discutido recentemente o papel de células regulatórias das respostas Th2. A hipótese baseia-se na idéia de que o contato prévio com micobactérias ambientais ou helmintos (muito comum nos países em desenvolvimento) gera respostas Th2 (IL-4) capazes de criar um ambiente modulador das respostas Th1. Isso porque, mesmo quando as respostas geradas na TB são do padrão Th1 a presença de IL-4 promoveria uma desativação dos macrófagos, com favorecimento do crescimento bacteriano; regulação negativa da expressão de iNOs; indução de toxicidade por TNF- $\alpha$ , resultando em imunopatologia e aumento da fibrose pulmonar, tudo isso contribuiria para a ineficiência da resposta desencadeada. Diante disso, o grupo que discute essa nova questão acredita que o desenvolvimento de vacinas contra TB deva levar em conta a indução de mecanismos reguladores das respostas Th2 (ROOK *et al*, 2005).

### **1.3- Vacinação**

O processo de vacinação consiste em induzir o sistema imune do indivíduo a responder de forma rápida e específica frente ao encontro com algum microorganismo ou componente produzido por ele (toxina). Atualmente, o aumento do conhecimento no campo da imunologia está levando ao desenvolvimento racional de novas vacinas, visando a estimulação de resposta imune específica, protetora e de longa duração. A primeira etapa deste desenvolvimento consiste em identificar o alvo para o qual se quer induzir a resposta imunológica, e esse alvo pode ser uma toxina ou o patógeno propriamente dito. A etapa seguinte consiste em definir quais os elementos da resposta imune são importantes para eliminar o alvo e, em seguida, desenvolver as estratégias necessárias para alcançar tal fim.

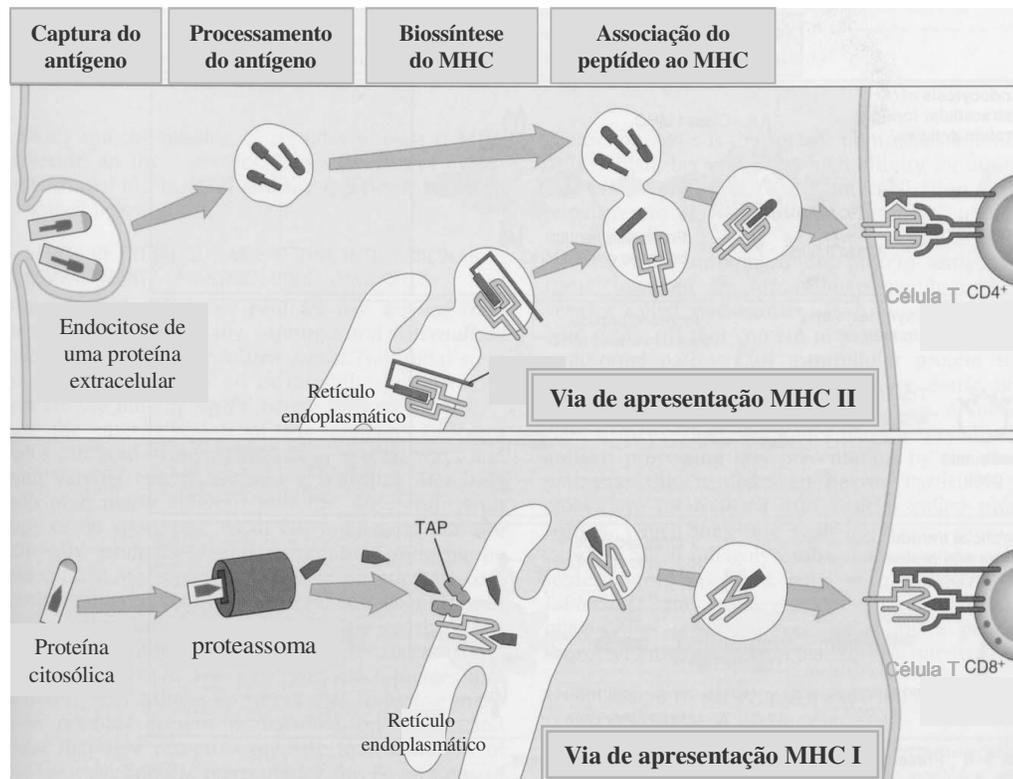
As vacinas de primeira geração, baseadas em microorganismos vivos, atenuados ou mortos, constituem a maioria das vacinas de uso humano. Problemas relacionados à dificuldade de reprodutibilidade entre lotes dessa vacina e, especialmente, questões relacionadas à utilização de microorganismos vivos têm levado à busca de outras alternativas. Novas estratégias abriram caminhos para inovações, particularmente no contexto do desenvolvimento de vacinas mais seguras, eficazes e polivalentes. Entre estas estão as de subunidades, consideradas de segunda geração, constituídas de antígenos purificados,

provenientes de fontes naturais, sintéticas ou mesmo recombinantes (RUBBARD *et al*, 1992). Estas vacinas representaram um ganho em termos de segurança de utilização mas, por outro lado, são menos imunogênicas o que faz necessário o uso de adjuvantes nas formulações. Mais recentemente, surgiram as vacinas gênicas ou de terceira geração, onde os genes ou fragmentos, que codificam antígenos potencialmente imunizantes, são carregados por plasmídeos de DNA (Esquema 1). Os genes isolados são ligados a outros fragmentos de DNA denominados plasmídeos, que permitem a replicação do gene em bactérias ou células eucarióticas (Revisto por GURUNATHAN & KLINMAN, 2000; ULMER *et al*, 1993; WOLFF *et al*, 1990). Estas vacinas têm se mostrado seguras e imunogênicas sendo capazes de estimular células T citotóxicas, porém estudos clínicos têm mostrado que algumas dessas vacinas, efetivas em estudos pré-clínicos (camundongos, cobaias, ratos), são pouco efetivas em humanos e animais de grande porte (BABIUK *et al*, 2003; DONNELLY *et al*, 2005).



**Esquema 1:** Processo de obtenção da vacina de DNA (Adaptado de Silva, 1999).

Independente do tipo de vacina a ser utilizada, a estratégia para se desenhar uma vacina efetiva contra uma dada infecção deve considerar a rota de apresentação antigênica (Esquema 2). Quando o antígeno é liberado no espaço extracelular, ele é capturado por uma APC e os fragmentos antigênicos apresentados para células T CD4. Essas células por sua vez liberam citocinas que podem promover a ativação de macrófagos e a secreção de anticorpos por células B. Entretanto, quando uma resposta citotóxica é requerida, como no caso de patógenos intracelulares, o antígeno deve ser liberado no citosol da APC para ativar os linfócitos T citotóxicos. Outro ponto a ser considerado, é que uma vacina deve fornecer três sinais distintos ao sistema imune para se estimular uma resposta adequada. O primeiro sinal é fornecido pelo antígeno que será capturado, processado e apresentado por uma APC às células imunoefetoras, tornando-se alvo da resposta imune e conferindo especificidade à mesma. Porém, o sinal mediado pela apresentação do antígeno não é suficiente para promover a diferenciação de células T *naive* em células efetoras. Desta forma, a vacina deve conter algo, além do antígeno, que seja capaz de ativar a célula apresentadora, o segundo sinal. Este componente, capaz de ativar as APCs pela modulação positiva da expressão de moléculas co-estimulatórias é essencial para a ativação de linfócitos, prevenindo que eles se tornem anérgicos (RESCIGNO *et al*, 1999). Assim, as APCs que recebem estes dois sinais tornam-se aptas a desencadear a resposta de células T contra um dado antígeno promovendo a sobrevivência, diferenciação de células T *naive* em células T efetoras e a produção de citocinas. Uma vez ativada, a célula T efetora pode se diferenciar em sub-populações diferentes que secretam citocinas com padrões distintos. As citocinas de padrão Th1, como o IFN- $\gamma$ , estimulam a defesa mediada por macrófagos sendo especialmente importante contra patógenos intracelulares. Já as citocinas de padrão Th2, que incluem IL-4 e IL-5, estimulam a produção de IgE, reações imunes mediadas por eosinófilos e mastócitos e regulam negativamente a resposta de padrão Th1. A diferenciação de uma célula T efetora em Th1 ou Th2 é dirigida por mediadores solúveis presentes no microambiente onde ocorre a apresentação antigênica. Assim, o terceiro sinal irá estimular a secreção desses mediadores que criarão um microambiente propício para dirigir a diferenciação das células T específicas e efetoras em Th1 ou Th2. No caso das vacinas de 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> gerações, os sinais adicionais ao sinal antigênico podem ser fornecidos por adjuvantes que compõe a formulação vacinal.



**Esquema 2:** Rota da apresentação antigênica (Adaptado de Abbas *et al*, 1999).

#### 1.4– Adjuvantes

A possibilidade de se utilizar frações purificadas de antígenos ou mesmo antígenos sintéticos, substituindo microorganismos atenuados ou mortos, tem contribuído para aumentar a segurança das vacinas. Entretanto, este aumento da segurança vem acompanhado de uma diminuição da capacidade do imunógeno em estimular uma resposta imune efetiva. Uma estratégia para minimizar o problema da baixa imunogenicidade de frações purificadas de proteínas seria a utilização de adjuvantes.

Por adjuvante entende-se qualquer material que, juntamente com o antígeno, estimule a resposta imune efetiva contra este último. Assim, o propósito de um adjuvante é simplesmente aumentar a imunogenicidade de um antígeno e modular a resposta desencadeada para o mesmo tornando-a efetiva. De forma geral, os adjuvantes podem agir sobre o antígeno, sobre as células do hospedeiro envolvidas na resposta imune, ou sobre ambos (KHAN *et al*, 1994). Seus principais mecanismos de ação são: (I) a formação de depósito no sítio de injeção, (II) a possibilidade de servir de veículo para o antígeno, facilitando a sua captação por células imunocompetentes e (III) a ação intrínseca como

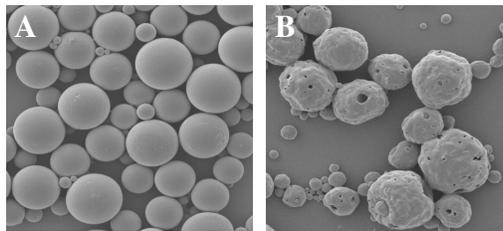
imunoestimulantes. Numerosos problemas são encontrados no desenvolvimento e utilização de adjuvantes em vacinas humanas, sendo a toxicidade e os efeitos colaterais os principais. O adjuvante licenciado e mais usado em vacinas humanas (baseado em sais de alumínio) só é efetivo nas vacinas que requerem a indução de resposta imune humoral (vacinas para difteria, tétano e hepatite B, por exemplo) uma vez que esse adjuvante favorece o desenvolvimento de respostas do tipo Th2 (BREWER *et al*, 1999). No caso da TB, a proteção requer o desenvolvimento de respostas celulares do tipo Th1, por esse motivo o uso de adjuvantes baseados nos sais de alumínio diminui a proteção contra *M. tuberculosis* (LINDBLAD *et al*, 1997).

Uma série de novos adjuvantes tem sido estudada, isso porque tem se mostrado que os adjuvantes têm importante papel na formulação vacinal. De maneira simplificada pode-se dividir os adjuvantes em duas classes, os sistemas carreadores e os imunomoduladores. Os carreadores ou adjuvantes particulados são capazes de organizar os antígenos na forma de partículas, pequenos agregados, gotas ou precipitados, onde tal apresentação é um importante componente para sua atividade adjuvante (COX & COULTER, 1992). O adjuvante completo (FCA) e incompleto de Freund (FIA), sais de alumínio, lipossomas, microesferas, e complexos imunoestimulatórios (ISCOMs), são alguns exemplos desse tipo de adjuvante. Como imunomoduladores ou adjuvantes não particulados têm sido estudados as saponinas, o lipídio A, os derivados do muramilo dipeptídeo (MDP) e os CpG-ODN. Muitos desses adjuvantes têm sido combinados dando origem a formulações como o Ribi que é uma emulsão A/O contendo MPL, DMT e CWS (RUDBACH, 1995) e ISCOMs, complexos contendo saponinas (MOREIN *et al*, 1984), os quais têm se mostrado muito mais potentes que os seus componentes utilizados de forma isolada. Assim é consenso de que para formular uma vacina de subunidade eficaz é necessário associar o antígeno a dois tipos de adjuvantes, (1) com propriedades imunoestimulatórias e (2) a carreadores (revisto por O'HAGAN & VALIANTE, 2003).

Dentre os sistemas carreadores de antígenos destacamos as microesferas que são partículas poliméricas esféricas cujo diâmetro varia entre 1 e 250  $\mu\text{m}$  e são constituídas por um sistema matricial no qual o antígeno a ser encapsulado está dissolvido ou disperso (COUVREUR & PUISIEUX, 1993). Estas microesferas são constituídas de poli-ésteres do ácido lático e glicólico (PLGA) e possuem a vantagem de serem biodegradáveis, o que evita as manifestações ulcerativas no sítio de administração se utilizadas por via parenteral. No organismo, estes polímeros são hidrolisados e uma vez degradados, liberam o ácido lático e o glicólico que são substratos inócuos ao organismo (BAZILE *et al*, 1992). Tais características

conferem a este sistema os requisitos necessários para sua utilização na clínica humana. Além disso, sua potencialidade de utilização como adjuvante reside também no fato de formarem, após administração subcutânea ou intramuscular, um depósito onde o antígeno é liberado lentamente de acordo com o polímero utilizado na sua fabricação.

Os polímeros derivados do ácido lático e glicólico já são utilizados na clínica humana para fins cirúrgicos na composição de fios de sutura e de implantes (LEWIS, 1990). 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 (Esquema 3). 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).



**Esquema 3:** Micrografia eletrônica de varredura mostrando microesferas de PLGA50:50. A) Microesferas recém preparadas; B) Microesferas 20 dias após o início do ensaio de liberação *in vitro* do antígeno (Adaptado de Lima, 1998).

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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  seriam responsáveis pela formação do depósito e liberação do antígeno por um período prolongado (CLELAND, 1995; O'HAGAN *et al*, 1993).

Enquanto formulação, as microesferas oferecem ainda uma vantagem no que concerne à sua estabilidade, visto que elas são armazenadas na forma de pó liofilizado a ser reconstituído imediatamente antes da sua utilização.

## **1.5- Vacinas contra tuberculose**

### ***1.5.1 - Vacina de uso corrente contra TB: BCG***

A vacinação ainda representa a melhor alternativa para a proteção dos indivíduos contra a TB e a vacina utilizada desde 1921 é o bacilo de Calmette-Guérin (BCG). Essa é uma vacina viva que protege contra as formas mais graves de tuberculose em crianças e também protege contra hanseníase. A OMS preconiza a vacinação com BCG em áreas de alta prevalência e incidência de TB. A BCG é uma vacina de baixo custo que já foi administrada a mais de 2,5 bilhões de pessoas desde 1948. Também foi licenciada para o tratamento de câncer de bexiga. Quando a BCG foi introduzida como vacina, esperava-se que ela pudesse controlar e até mesmo erradicar a TB (Revisto por HASHIMOTO, 1997). Embora venha sendo amplamente utilizada essa vacina não é efetiva em algumas populações e prejudica a interpretação do teste de hipersensibilidade cutânea ou teste de PPD, utilizado com fins diagnóstico e epidemiológico (FINE *et al*, 1999).

A vacina BCG de uso corrente foi originalmente obtida de um isolado clínico de *M. bovis*, atenuado em laboratório através de 230 passagens seriadas por meio de cultura entre os anos de 1908–1921. Uma das várias razões propostas para explicar a variabilidade de eficácia é a diversidade de cepas da BCG. É claro agora, após os estudos do genoma desse microorganismo, que após muitos anos de crescimento e repiques em diferentes laboratórios, diversas cepas da vacina BCG foram geradas por meio de deleções, de duplicações ou

mudanças no número de cópias de seqüências de alguns genes de uma região conhecida como RD1 (Revisto por MARTIN, 2005).

No que concerne à segurança da BCG, existe uma preocupação crescente com o uso de organismos vivos em indivíduos imunocomprometidos, fato especialmente agravante se considerarmos que no caso da TB, a co-infecção pelo HIV tem se tornado cada vez mais comum (GRANGE, 1994; PERRONNE, 1994).

Por todos os motivos acima expostos, a procura por uma alternativa de imunização mais segura e eficaz para a tuberculose tem levado muitos pesquisadores a investirem no desenvolvimento de novas vacinas.

### ***1.5.2 - Vacinas de primeira geração***

Apesar da preocupação com o risco de reversão de virulência das vacinas baseadas em organismos vivos o seu uso em novas vacinas contra TB ainda tem sido bastante explorado.

Uma das estratégias bastante utilizadas para o desenvolvimento de novas vacinas contra a tuberculose é a introdução de genes que codificam antígenos relevantes para a resposta contra TB no BCG. Os candidatos conhecidos por BCGs recombinantes são BCGs nos quais foram introduzidos plasmídeos para expressão de proteínas recombinantes. Um desses candidatos é o rBCG30 (HORWITZ *et al*, 2005), essa vacina inclui uma cópia extra do gene para uma proteína secretada de *M. tuberculosis*, o antígeno 85B (Ag85B). Em modelo experimental essa vacina mostrou-se efetiva na proteção contra TB e entrou para os testes clínicos de fase I no início de 2004. Um outro candidato à vacina contra TB é o BCG expressando a listerolisina de *Listeria monocitogenes*, r-BCG-hly (HESS *et al*, 1998). Esse gene seria importante para promover o escape dos bacilos para o citosol da célula do hospedeiro infectada e por essa característica poderia induzir resposta de células T CD8, associadas à proteção contra a doença.

Outra estratégia recentemente introduzida foi o *prime-boost* heterólogo que consiste na administração de um mesmo antígeno sob formas diferentes (McSHANE, 2001). No caso da tuberculose, a maioria destas estratégias é baseada na administração de uma dose de BCG vivo e, após algum tempo, de uma dose de reforço com uma outra vacina contra TB, diferente do BCG. A dose de reforço pode ser uma vacina de subunidade (proteína ou DNA) ou uma vacina viva e tem como função estimular uma forte resposta imune. Vários são os antígenos testados com esta estratégia, entretanto, uma candidata promissora é a vacina MVA85 baseada em um vetor viral, o vírus da vaccinia Ankara recombinante, modificado pela adição do gene que codifica o antígeno 85A (McSHANE, 2003). Testes clínicos de fase I com essa

vacina mostraram 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 a dose de reforço.

Além das vacinas vivas baseadas no BCG melhorado ou no *prime-boost* também tem se proposto a utilização de mutantes auxotróficos do próprio *M. tuberculosis* como novos candidatos a vacinas contra TB (GULERIA *et al*, 1996; PEREZ *et al*, 2001; SMITH *et al*, 2001). Esses mutantes são atenuados e não conseguem se multiplicar nos indivíduos vacinados porque apresentam necessidades especiais de nutrientes, que só podem ser encontradas em condições artificiais de cultura. Entretanto, esta estratégia re-introduz questões relacionadas à utilização de vacinas vivas atenuadas que haviam sido superadas pela utilização de vacinas de subunidade. No caso de utilização de vetores virais existe ainda o problema de desencadeamento de resposta imune contra o vetor o que prejudicaria uma segunda administração do mesmo. Nesse caso as vacinas de subunidade têm vantagens em relação a vacinas baseadas em organismos vivos como micobacterias, não só por serem mais seguras como também pela maior facilidade no controle de qualidade da produção da vacina manufaturada. Entretanto, é preciso lembrar que, para conferir a complexa imunidade requerida para a proteção contra tuberculose, é possível que mais de um antígeno seja necessário para a formulação de uma vacina eficaz (MARTIN, 2005).

### ***1.5.3 - Vacinas de segunda geração***

Atualmente tem se desenvolvido uma grande quantidade de vacinas de subunidade contra TB. A Mtb72F, por exemplo, 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 o reforço para a vacina de BCG (BRANDT *et al*, 2004) apresentando resultados promissores que a levaram ao estudo clínico de fase I, sendo essa a primeira vacina recombinante contra TB a ser testada em humanos (SKEIKY *et al*, 2004). Além desse candidato, uma outra proteína de fusão baseada nos antígenos Ag85B e ESAT6 deve iniciar os testes clínicos de fase I (JAN *et al*, 2005).

A grande maioria das proteínas testadas tem origem no filtrado de cultura de *M. tuberculosis* (CFP). O CFP contém aproximadamente 200 proteínas, e esse perfil muda dependendo da fase em que se encontra a cultura (COVERT *et al*, 2001). Dentre as várias proteínas majoritárias inclui-se a família do Ag85 (micolil transferase), MPT32, MPT51,

MPT64, GroES, ESAT-6, DnaK e GlnA. Desses, o Ag85 e ESAT-6 conferiram melhor proteção (ANDERSEN *et al*, 2001).

#### ***1.5.4 - Vacinas de terceira geração***

Uma grande quantidade de antígenos também tem sido estudada sob a forma de vacinas de DNA, conhecidas como vacinas de terceira geração. Assim, as vacinas baseadas em genes que codificam proteínas da família do Ag85 (HUYGEN *et al*, 1996), ESAT-6, Hsp70, proteína de 36kDa e MPT83 (LOWRIE *et al*, 1997), Pho S (ZHU *et al*, 1997), PLCa (GONÇALVES *et al*, 2001) e Hsp65 (SILVA *et al*, 1994) ou uma combinação das mesmas têm sido alvo de muitas investigações. Dentre estes, o Antígeno 85 (Ag85) e a proteína de choque térmico de 65kDa (Hsp65) foram os antígenos mais estudados. A vacina de DNA-Ag85A desenvolvida pelo grupo de Baldwin e colaboradores (1999) induziu uma resposta imune humoral e celular específicas e também se mostrou efetiva em proteger animais contra a infecção por *M. tuberculosis*. Os resultados com a vacina de DNA-Hsp65 (LOWRIE *et al*, 1995), extensivamente estudada por nosso grupo, serão discutidos a seguir.

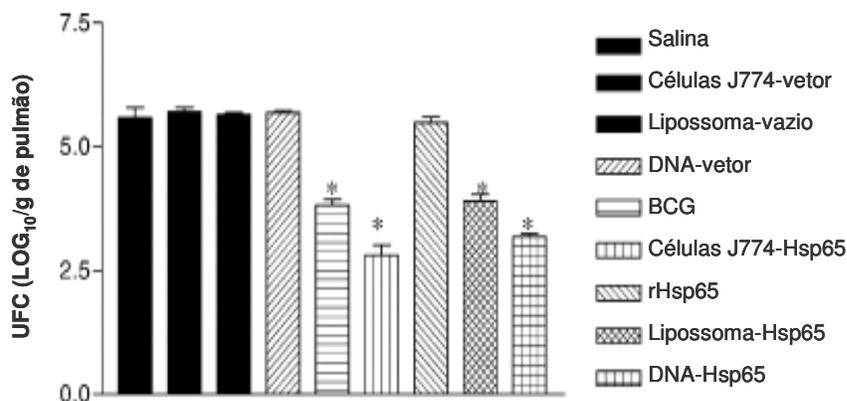
#### ***1.5.5- Desenvolvimento da vacina baseada no antígeno Hsp65***

As proteínas de choque térmico (Hsp), ou chaperoninas, são moléculas altamente conservadas entre as espécies e desempenham papel importante no dobramento e translocação de proteínas e montagem de complexos protéicos. A síntese de Hsps aumenta nas situações de estresse como um mecanismo de proteção celular. Nas infecções por micobactérias, a reatividade contra Hsp é predominante, sendo a Hsp65 o antígeno imunodominante dentre elas e por isso alvo da resposta de anticorpos ou células T, tanto em camundongos como em humanos (KAUFMANN *et al*, 1990; YOUNG, 1990). Anticorpos anti-Hsp65 foram detectados em pacientes com hanseníase e tuberculose (SHINNICK, 1991). Além disso, células T CD4 específicas para a Hsp65 foram encontradas em pacientes com hanseníase ou vacinados com BCG (MUSTAFA *et al*, 1993). Em camundongos vacinados com *M. tuberculosis* inativado, cerca de 20% dos clones de células T CD4 reativas contra o bacilo são específicas para a Hsp65 (KAUFMANN *et al*, 1987), sugerindo, portanto, que essas células desempenham algum papel importante durante a infecção micobacteriana.

Desde o início da década de 90, Silva e colaboradores vêm estudando a utilização da proteína de choque térmico de 65 kDa de *M. leprae* (Hsp65) como antígeno para desenvolvimento de vacina contra tuberculose. Estudos envolvendo transferência adotiva de células transfectadas expressando o antígeno Hsp65 (macrófagos de linhagem celular ou

células da medula óssea) induziram forte proteção contra infecção desafio com cepa virulenta de *M. tuberculosis* em modelo experimental. Em estudos posteriores mostrou-se que a proteção contra tuberculose também poderia ser obtida pela injeção de plasmídeo codificando o gene dessa proteína ou ainda pela injeção de lipossomas contendo a proteína recombinante, mas não pela administração da proteína em adjuvante incompleto de Freund (FIA). Os antígenos protéicos são processados de forma diferente de acordo com a forma como são apresentados para as células do sistema imune. Assim, existem antígenos de origem endógena ou exógena; os antígenos endógenos são aqueles que se encontram no citoplasma de qualquer célula. Esses antígenos são processados por qualquer célula nucleada e podem ser apresentados via moléculas de MHC-I para células T CD8. Os antígenos de origem exógena, como aqueles capturados pelas células apresentadoras (APC), são processados e apresentados via moléculas de MHC-II para células T CD4. Nosso grupo demonstrou que todas as estratégias que permitiram que o antígeno fosse liberado no citoplasma celular (endógeno) foram protetoras contra a TB experimental. Assim, a proteção está associada à forma como o antígeno é apresentado ao sistema imune, ou seja, quando o antígeno foi colocado no citoplasma da célula (endógeno), a resposta desencadeada foi capaz de proteger contra a infecção (Esquema 4). Os macrófagos ou células de medula óssea transfectados com o gene da Hsp65 são capazes de disponibilizar o antígeno endogenamente e, em consequência disso, estimulam as células T CD8 do hospedeiro. Assim também o fazem o DNA-Hsp65 em solução e os lipossomas carreando a proteína Hsp65. Entretanto, a vacina baseada na proteína Hsp65 recombinante formulada em adjuvante incompleto de Freund não tem a capacidade de promover a liberação do antígeno no citoplasma celular e, em consequência disso, não foi protetora contra a TB experimental.

Estudos do nosso grupo mostraram, que células T CD8 citotóxicas e células T CD4 de padrão Th1 estão associadas à proteção contra infecção desafio no modelo experimental utilizado (BONATO *et al*, 1998; LOWRIE *et al*, 1994; LOWRIE *et al*, 1997; SILVA & LOWRIE, 1994; SILVA *et al*, 1994; SILVA *et al*, 1996). Por meio de experimentos de transferência adotiva de células foi detalhadamente descrito o fenótipo das células envolvidas na proteção contra TB. Assim, as células de fenótipo T CD8/CD44<sup>high</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  e citotóxicas foram as mais eficientes na proteção contra a infecção. As células T CD4/CD44<sup>high</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  também conferiram proteção, porém foram menos eficientes que as células T CD8 (SILVA *et al*, 1999). Assim, uma vacina eficiente contra a tuberculose precisa estimular adequadamente esses tipos celulares.



**Esquema 4:** Avaliação do número de UFC no pulmão de animais da linhagem BALB/c vacinados e desafiados, 30 dias após a infecção. \* Diferença estatística significativa em comparação ao controle (Teste de Dunnet). Os animais foram vacinados com os seguintes tratamentos: Hsp65 recombinante de *M. leprae* (rHsp65, 25 µg) foi emulsificada em adjuvante incompleto de Freund e administrada por via subcutânea (100 µL) duas vezes em intervalos semanais e, então, 25 µg em salina foi administrado por via endovenosa. Macrófagos de linhagem tumoral originadas de BALB/c (J774-G8) que produzem Hsp65 (J774-Hsp65) foram administradas semanalmente (10<sup>5</sup> células) pela via endovenosa por 4 semanas. Para a vacinação com DNA administraram-se por via intramuscular 50 µg de DNA em 50 µL de salina em cada musculo quadriceps, em 4 ocasiões em intervalos de 3 semanas entre cada administração. A proteína Hsp65 formulada em lipossomas (5 µg/dose) foi administrada em 4 doses por via endovenosa em intervalo de duas semanas. O BCG foi administrado em dose única por via subcutânea (10<sup>5</sup> bacilos em 50 µL de salina). Controles adicionais receberam salina, lipossomas vazios, plasmídeo vetor ou células J774-vetor. A infecção desafio foi realizada 30 dias após a vacinação por via endovenosa (1x10<sup>5</sup> bacilos de *M. tuberculosis* H37Rv). Os animais foram mortos 4 semanas após a infecção e o número de bactérias vivas nos pulmões foi determinado pela contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) através do plaqueamento de diluições seriadas do tecido homogeneizado em meio agar 7H11, a contagem foi feita após 21 dias de incubação a 37°C e expressa como Log<sub>10</sub>UFC. (Adaptado de Lima *et al*, 2004).

#### ➤ Vacina baseada noDNA-Hsp65 em solução e Gene Gun

Nesse contexto as vacinas de DNA apresentam uma série de vantagens porque além de estimular a resposta imune celular e humoral são capazes de induzir respostas de células T CD8. Ao transfectar as células do hospedeiro o DNA dirige a síntese do antígeno codificado e o mesmo é expresso e liberado no citoplasma celular e, por isso, é apresentado via moléculas MHC-I a células T CD8. A primeira evidência de que a vacina de DNA poderia ser utilizada para gerar imunidade contra tuberculose foi demonstrada por Silva e colaboradores (1994).

Assim, a administração de 4 doses da vacina de DNA plasmidial contendo o gene da Hsp65 de *M. leprae*, por via intramuscular, a camundongos BALB/c foi efetiva na prevenção e a sua administração a animais previamente infectados também se mostrou eficiente na terapia contra tuberculose, ou seja, a vacina de DNA-Hsp65 apresentou atividade profilática e terapêutica contra TB (LOWRIE *et al*, 1999).

Para o desenvolvimento de uma resposta profilática e terapêutica com o DNA-Hsp65 no modelo experimental de tuberculose, foi necessário administrar aos camundongos grande quantidade de DNA em solução, bem como, múltiplas doses (LOWRIE *et al*, 1997). No que diz respeito às vacinas em desenvolvimento, existe uma necessidade de simplificar os esquemas de imunização, reduzindo-se o número de doses necessárias para estimular

imunidade protetora. Para isso, diferentes estratégias têm sido empregadas envolvendo a utilização de diferentes tipos de adjuvantes (MOREIN, 1996). Assim, a fim de otimizar a vacina visando a redução da quantidade de DNA injetado, avaliou-se a sua administração pela via intradérmica com o uso de *gene gun*. A biobalística ou *gene gun* consiste na transfecção celular com DNA adsorvido em partículas de ouro. Nesse sistema essas partículas são aceleradas através de uma descarga de gás hélio sob alta pressão e liberadas dentro das células do tecido alvo. A introdução direta do DNA na célula do hospedeiro evita a sua degradação. A administração de DNA-Hsp65 por *gene gun* estimulou ambos os tipos de resposta imune, humoral e celular, com uma dose 100 vezes menor do que a utilizada nos protocolos convencionais de injeção intramuscular, entretanto, não estimulou uma resposta protetora (LIMA *et al*, 2003).

➤ ***Vacina baseada no DNA-Hsp65 encapsulado em microesferas de PLGA***

Uma segunda estratégia para otimizar a vacina de DNA-Hsp65 consistiu no seu encapsulamento em microesferas poliméricas biodegradáveis juntamente com um adjuvante. O adjuvante escolhido foi o DMT, um glicolípido da parede micobacteriana com propriedades imunoestimulantes. Esse adjuvante vinha sendo estudado por nosso grupo, em modelo de tuberculose experimental, e apresentou importante função na indução de citocinas e o recrutamento celular (LIMA *et al*, 2001a). Com a introdução desse imunomodulador na formulação vacinal induziu-se proteção significativa contra infecção com *M. tuberculosis* H37Rv, comparável à resposta obtida com administrações do DNA-Hsp65 em solução. Entretanto, é necessário ressaltar que a formulação composta por microesferas contendo DMT e DNA-Hsp65 foi capaz de estimular a resposta imune protetora após uma única administração, enquanto que a injeção intramuscular do DNA em solução requer múltiplas doses e 10 vezes mais DNA para conferir a mesma proteção (LIMA *et al*, 2004).

Nosso grupo também tentou explorar a estratégia de “prime-boost” homólogo utilizando um vacina de dose única. No “prime-boost” heterólogo um mesmo antígeno é administrado sob formas diferentes. Uma estratégia muito comum é a administração de uma primeira dose de BCG e a segunda dose ou reforço é uma outra formulação diferente do BCG, e pode ser uma vacina de subunidade (proteína ou DNA) ou até mesmo um outro microorganismo vivo. Nossa estratégia foi um pouco diferente porque o “prime” e o “boost” foram administrados em uma única dose; isso porque o DNA-Hsp65 foi encapsulado em microesferas de liberação rápida e a proteína recombinante em microesferas de liberação mais lenta. Assim, numa única dose o DNA foi responsável pela estimulação inicial do sistema

imune e a proteína foi liberada em período mais tardio, sendo por isso responsável pela dose de reforço da imunização. Essa estratégia inovadora mostrou-se muito promissora porque estimulou respostas celulares de longa duração (RUBERTI *et al.*, 2004).

Conforme mostramos nos parágrafos anteriores a formulação da vacina baseada no DNA-Hsp65 vem sendo otimizada desde que foi indicada pela OMS como uma candidata promissora para os estudos clínicos contra TB (ENSERINK, 2001). Dada a necessidade de se obter uma formulação adequada para os estudos clínicos também iniciamos, em paralelo, o desenvolvimento de vacinas de subunidade baseadas na proteína Hsp65 e adjuvantes.

➤ ***Vacina baseada na proteína Hsp65 recombinante***

A liberação da proteína Hsp65 recombinante no interior de células, utilizando lipossomas como carreadores, foi capaz de estimular resposta imune protetora nos camundongos imunizados, após 4 administrações por via intravenosa (LIMA *et al.*, 2001b). Nesse caso, como o antígeno foi liberado de uma só vez, a resposta foi de curta duração. Para induzir uma resposta protetora mais duradoura seria necessário administrar doses complementares do antígeno. Para tentar resolver esse problema a proteína foi encapsulada em microesferas biodegradáveis. Essa estratégia representa uma alternativa para substituir as doses de reforço, já que nesse sistema a liberação do antígeno pode ser sustentada por um prolongado período de tempo após uma única administração. Além de representar uma alternativa para gerar imunidade duradoura também oferece a vantagem de vetorizar o antígeno para células apresentadoras de antígeno (LIMA & RODRIGUES JR, 1999).

Nossos estudos com a proteína Hsp65 recombinante encapsulada em microesferas mostraram que a proteína é liberada em um intervalo de 30 dias e que a técnica utilizada no encapsulamento não altera as características estruturais da proteína. Em camundongos BALB/c, esta formulação foi capaz de induzir elevada produção de anticorpos específicos após administração de única dose correspondente a 10 µg de proteína. Entretanto, esta formulação, ao contrário da proteína recombinante em lipossomas, não foi capaz de conferir proteção aos camundongos imunizados e desafiados com cepa virulenta de *M. tuberculosis*. Esta diferença na capacidade de induzir proteção entre a formulação veiculada por lipossomas e por microesferas pode ser atribuída ao fato dos lipídeos, utilizados na composição da primeira, apresentarem propriedade imunoestimulante induzindo a produção de IFN-γ. Neste contexto, a associação de um adjuvante, com características imunoestimulantes, à formulação de proteína em microesferas representa uma estratégia interessante para a indução de uma resposta imune protetora. Apesar das suas propriedades adjuvantes o DMT co-encapsulado

com a proteína Hsp65 em microesferas não foi efetivo em proteger camundongos contra TB. Assim, a avaliação de outros compostos imunoestimulantes foi necessária a fim de compor um sistema adequado para a utilização como vacina. Por ser uma molécula hidrofóbica o DMT foi incorporado na matriz da microesfera, enquanto a proteína foi incorporada na fase aquosa do sistema. Baseando-se nessa observação, a escolha de novos imunoestimulantes foi norteada pela possibilidade de se incorporar o adjuvante na mesma fase em que se encontrava a proteína. Juntamente com a necessidade de incluir um imunoestimulante na composição da formulação vacinal também foi necessário, para garantir a segurança da vacina, a utilização de uma proteína com baixos níveis de contaminação por endotoxinas (LPS). Isso porque esse componente natural da parede de bactérias gram-negativas é um contaminante comum de soluções de proteínas purificadas a partir de sistemas de expressão bacterianos. Esses contaminantes são conhecidos por sua capacidade pirogênica e efeitos sobre o sistema imunológico e por esse motivo são indesejáveis quando se discute a formulação de vacinas. Entretanto, para aproveitar o seu efeito adjuvante têm se buscado alguns derivados do LPS que sejam menos tóxicos e possam ser utilizados como adjuvantes na clínica humana.

Assim, para compor as formulações vacinais vislumbramos a utilização da proteína recombinante (Hsp65), com baixos níveis de contaminação por LPS, e dos adjuvantes: (1) microesferas, como sistemas carreadores e (2) moléculas com propriedades imunomodulatórias. Dentre os imunomoduladores disponíveis foram escolhidos 3 para esse estudo: o KLK, a Poli-L-arginina e o CpG, todos eles hidrofílicos para que fossem incorporados na mesma fase em que a proteína foi encapsulada.

O polipeptídeo sintético KLK é derivado de uma classe de peptídeos antimicrobianos que ocorrem naturalmente em insetos, atuam como parte da sua resposta imune inata e estão envolvidos na defesa contra uma série de patógenos. Vários desses peptídeos antibióticos, que ocorrem naturalmente, têm sido descritos (DESTOUMIEUX-GARZON *et al*, 2001; LEEM *et al*, 1999; SCHITTEK *et al*, 2001; TASIEMSKI *et al*, 2002), incluindo um grande grupo de peptídeos antimicrobianos catiônicos, os CAMPs (ZASLOFF, 2002 e 2005). Esses CAMPs são encontrados principalmente nos sítios de exposição e invasão por microorganismos. São secretados nos fluidos corporais ou estocados em grânulos citoplasmáticos de fagócitos profissionais e são produzidos em grande quantidade nos sítios de infecção e inflamação. Em mamíferos quatro grupos foram descritos: defensinas- $\alpha$ , defensinas- $\beta$ , defensinas- $\theta$  e catelicidinas (LEHRER & GANZ, 2002; GUDMUNDSSON & AGERBERTH, 1999; ZAIYOU & GALLO, 2002) e todos eles são capazes de promover a morte ou inibir o crescimento de uma variedade de agentes infecciosos, incluindo bactérias, fungos, vírus e

parasitas (BOMAN, 2000). Além de sua atividade microbicida, a ação dos CAMPs tem impacto na qualidade, efetividade e direcionamento das respostas imunes, atuando também na interface entre a resposta inata e adaptativa (HANCOCK, 2000). Certos CAMPs por exemplo são capazes de recrutar diferentes subclasses de células do sistema imune (YANG *et al*, 2002). Além disso, quimiocinas e peptídeos derivados de quimiocinas apresentam propriedades antimicrobianas, indicando uma possível sobreposição funcional de quimiocinas e CAMPs (COLE *et al*, 2001; KRIJGSVELD *et al*, 2000; TANG *et al*, 2002). Recentemente, foram descritas atividades imunoestimulantes para alguns CAMPs. As defensinas- $\alpha$  produzidas por neutrófilos humanos, por exemplo, além de aumentar a produção de anticorpos específicos (IgG) no soro também aumentam a liberação de interferon (IFN- $\gamma$ ), IL-5, IL-6 e IL-10 por células T CD4 (LILLARD *et al*, 1999; TANI *et al*, 2000). Assim, por essas propriedades imunoestimulantes as defensinas são candidatas interessantes para o desenho de vacinas. Entretanto, pela dificuldade em purificá-los na sua fonte natural têm se utilizado CAMPs artificiais como novas drogas antimicrobianas e o uso de alguns desses CAMPs já está em fase de testes clínicos (HANCOCK, 1999; VAN'T HOF, 2001). Um exemplo interessante de CAMP artificial é o undecapeptídeo derivado da sapecina B, que foi modificado para aumentar sua atividade contra *Staphylococcus aureus* (ALVAREZ-BRAVO *et al*, 1994). Este peptídeo artificial, o H-KLKLLLLLLKLK-NH<sub>2</sub> (KLKL<sub>5</sub>KLK-NH<sub>2</sub> ou KLK), apresenta uma atividade quimioterapêutica significativa em camundongos infectados por *S. aureus* (NAKAJIMA *et al*, 1997). Além disso, por meio da interação com receptores na superfície de neutrófilos humanos e monócitos (U937), induzem a produção de ânions superóxido por essas células (CHO *et al*, 1999). A atividade quimioterapêutica do KLK está relacionada a sua capacidade de ativar neutrófilos e monócitos. Mais recentemente investigou-se a capacidade desse peptídeo em atuar como adjuvante. Esse estudo demonstrou que a co-injeção de antígeno com o KLK foi capaz de potencializar a resposta imune específica induzida e, nesse caso, para o padrão Th2 (FRITZ *et al*, 2004).

Um outro adjuvante de interesse nesse trabalho foi a poli-L-arginina (poliarginina), um poliaminoácido catiônico que tem sido bastante utilizado para aumentar a captura de peptídeos, proteína ou ácidos nucleicos por APCs. Esses peptídeos catiônicos, incluindo a poli-L-arginina e a poli-L-lisina, aumentam a captura de peptídeos derivados de antígenos tumorais por APC *in vitro* (BUSCHLE *et al*, 1997) e *in vivo* (MATTNER *et al*, 2002). Além disso, a injeção desses peptídeos juntamente com a poliarginina ou a polilisina aumentam a resposta imune específica contra o tumor, bem como conferem proteção contra o crescimento tumoral em vários modelos de estudo em camundongos (SCHMIDT *et al*, 1997). Esses

poliaminoácidos catiônicos têm sido utilizados em vários estudos de terapia genética como potentes carreadores de plasmídeos de DNA para células (GARNETT, 1999; HWANG & DAVIS, 2001). O mecanismo responsável por esse efeito não está claro, mas a captura dos antígenos co-injetados com a poliarginina parece ser mediada por receptores expressos na superfície das APCs e não parece envolver a via endocítica da captura celular (FUTAKI, 2001).

Uma série de novos compostos ativos como adjuvantes foi descoberta ou desenvolvida após a demonstração de que o DNA bacteriano, mas não o DNA de vertebrados, tem um efeito imunoestimulatório direto sobre células do sistema imune *in vitro* (MESSINA *et al*, 1991; RANKIN *et al*, 2001; TOKUNAGA *et al*, 1984). Esse efeito imunoestimulatório se deve à presença, em alta frequência, de dinucleotídeos CpG não metilados (KRIEG *et al*, 1995) no DNA bacteriano. Assim, os CpGs não metilados juntamente com algumas seqüências que os margeiam são reconhecidos por células do sistema imune inato fazendo com que o DNA derivado de patógeno seja discriminado do DNA próprio (BIRD, 1986). As respostas ao DNA CpG são mediadas pela ligação aos receptores tipo “toll”, TLR9 (HEMMI *et al*, 2000). Esses DNAs estimulam a resposta humoral pela ativação de células B, conferindo-lhes resistência à morte por apoptose induzida por ativação e/ou induzindo a secreção de IL 6 e IgM (YI *et al*, 1996). A resposta celular também pode ser estimulada pela ativação direta de monócitos e macrófagos levando a produção de citocinas, principalmente IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (CHACE *et al*, 1997; HALPERN *et al*, 1996) e pela ativação de células dendríticas, as quais aumentam a produção de citocinas e a expressão de moléculas coestimulatórias (JACOB *et al*, 1998). O efeito adjuvante Th1 do CpG parece ser maximizado pela sua conjugação com antígenos protéicos (KLINMAN *et al*, 1999) ou pela sua formulação em sistemas carreadores, o que permite que o antígeno e o adjuvante sejam liberados na mesma APC (SINGH *et al*, 2001). Nos últimos anos tem se descrito uma série de seqüências imunoestimulantes para o uso em primatas não humanos (HARTMANN *et al*, 2000) e também para o uso veterinário (RANKIN *et al*, 2001).

## **2. OBJETIVOS**

Conforme descrito anteriormente, a vacina de DNA-hsp65 administrada por via intramuscular apresenta ação profilática e terapêutica contra a tuberculose experimental. Entretanto, para que sua utilização no combate à tuberculose humana seja possível é necessário otimizá-la. Para atingir esse objetivo nosso grupo tem avaliado a utilização de sistemas para a liberação controlada do antígeno, a associação com adjuvantes imunoestimulantes, bem como, tem-se utilizado diversas vias e esquemas para a administração vacinal. Nesse contexto a formulação de vacinas de subunidade baseadas em antígenos recombinantes também pode representar uma estratégia adequada para a otimização. Isso porque essas vacinas são seguras, de fácil formulação, administração e produção. Apesar de ser menos imunogênica que as vacinas de DNA ou as baseadas em microorganismos vivos ou atenuados, a sua utilização tornou-se ainda mais viável após a descoberta de novos adjuvantes. Deste modo, a associação do antígeno recombinante com adjuvantes tem aumentado a imunogenicidade dessas vacinas. Assim, em paralelo ao desenvolvimento da vacina de DNA-Hsp65, também é importante desenvolver vacinas de subunidade baseadas na proteína Hsp65 recombinante e adjuvantes. Desta forma o presente trabalho teve como objetivo:

1. Purificar a proteína Hsp65 recombinante para as formulações vacinais visando a redução da contaminação por LPS proveniente do sistema de expressão utilizado (*E. coli*);
2. Desenvolver formulações vacinais, de dose única, baseadas na proteína recombinante Hsp65 (com diferentes quantidades de LPS) e os adjuvantes KLK, Poli-L-arginina ou CpG encapsulados em microesferas biodegradáveis (PLGA);
3. Avaliar a imunogenicidade e a proteção contra tuberculose conferida pelas formulações vacinais;

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1- Obtenção da proteína Hsp65 recombinante**

#### **3.1.1- Protocolo 1: Hsp65a**

Bactérias *E. coli* BL21 transformadas com o plasmídeo PIL161 contendo o gene da Hsp65 foram cultivadas em 500 mL de meio LB BROTH BASE (Gibco BRL, Scotland) contendo ampicilina (Sigma, St Louis, USA) na concentração de 100 µg/mL. Quando a cultura atingiu D.O. de 0,6 ( $\lambda= 600\text{nm}$ ) foi adicionado IPTG (Isopropylthio- $\beta$ -D-Galactoside, Gibco BRL) para a concentração final de 1 mM, e a cultura foi mantida a 37°C sob agitação a 250 rpm em agitador orbital por 18 horas. Após incubação, as células foram coletadas por centrifugação a 5000 x g por 15 minutos em centrífuga J2HS (Beckman), ressuspensas em 10 mL de tampão CE (Citrato de sódio 30 mM, EDTA 10 mM, pH 6,1) e rompidas por meio de 3 pulsos de 100 W com duração de 1 minuto, utilizando-se a sonda de ultrassom Vibra Cell™ (Sonics & Materials, USA) em banho de gelo. Após centrifugação a 20000 x g por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 30 mL de tampão UPE (Uréia 6 M, EDTA 20 mM, fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,0) e agitado por cerca de 3 minutos em homogeneizador tipo vortex. A suspensão foi mantida sob agitação suave à temperatura ambiente por 15 minutos e então centrifugada a 20000 x g por 20 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio para uma concentração final de 1,0 M, sendo posteriormente incubado em gelo por 30 minutos. Após centrifugação a 20000 x g por 20 minutos, o sedimento foi reconstituído em 3 mL de PBS e exaustivamente dialisado contra PBS (LAMB *et al*, 1988).

#### **3.1.2 - Protocolo 2: Hsp65b**

Bactérias *E. coli* ER2566 transformadas com o plasmídeo pET28 com tendo o gene da Hsp65, clonado pela Professora Dra Ana Paula Ulian de Araújo (USP-São Carlos), foram cultivadas em 2,5 L de meio LB BROTH BASE (Gibco BRL, Scotland) contendo canamicina na concentração de 30 µg/mL. Quando a cultura atingiu D.O. de 0,6 ( $\lambda= 600\text{nm}$ ) foi adicionado IPTG (Isopropylthio- $\beta$ -D-Galactoside, Gibco BRL) para a concentração final de 0,3 mM, e a cultura mantida a 30°C sob agitação de 250 rpm por 18 horas. Após incubação, as células foram coletadas por centrifugação a 5000 x g por 15 minutos em centrífuga J2HS (Beckman), ressuspensas em 20 mL de tampão fosfato e rompidas em homogeneizador de alta pressão, EmulsiFlex C5 (Avestin, Ottawa, Canadá). Após centrifugação de 20 minutos (20000 x g), o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 30 mL de tampão fosfato contendo 5 M de Uréia e após agitação por 1 hora a suspensão foi centrifugada a 20000 x g por 20 minutos e o sobrenadante coletado e submetido à cromatografia de afinidade

utilizando-se a coluna HiTrap (GE Healthcare), conforme o protocolo especificado pelo fornecedor. A amostra de proteína eluída da coluna foi dialisada contra água livre de endotoxinas. Para a purificação da proteína utilizou-se material descartável ou previamente tratado para a remoção de endotoxinas. O processo de despirogenização de vidrarias foi feito por meio da incubação desse material em forno a 200°C por 2 horas, já o material de plástico e a matriz da coluna foram despirogenizados por tratamento com uma solução 1 M de NaOH por 1 hora, seguido da sua lavagem com água livre de endotoxinas.

### **3.2 - Doseamento e caracterização da proteína recombinante**

O doseamento da proteína foi feito por espectrofotometria utilizando-se o reagente Coomassie para ensaios com proteínas (Pierce, Rockford, Illinois USA). A leitura foi realizada em  $\lambda = 600\text{nm}$  em leitor de ELISA  $\Sigma 960$  (Metertech).

A proteína foi caracterizada por eletroforese em gel de poliacrilamida e por “western blotting” utilizando-se o anticorpo anti-Hsp65 produzido no laboratório (CL44). Para a quantificação de endotoxinas empregou-se o teste de LAL utilizando o kit QCL-1000 Chromogenic LAL test (BioWhittaker).

### **3.3 - Encapsulamento da proteína e adjuvantes em microesferas**

As microesferas foram obtidas pelo método da emulsão múltipla e evaporação do solvente: a fase aquosa (0,2 mL) contendo Hsp65 recombinante (3 mg) e / ou os adjuvantes, Poliarginina ou KLK (2 mg) ou CpG 1668 (1mg), foi emulsionada numa solução de 200 mg de PLGA 50:50 (Resomer RG 505 da Boehringer Ingelheim) em 20 mL de cloreto de metileno, sob forte agitação (6000 rpm) com o auxílio de um homogeneizador do tipo Ultraturrax T 25 (IKA® - Labortechnik, Germany) para se obter uma emulsão primária água/óleo (A/O). Esta emulsão foi vertida na fase aquosa externa (100 mL), contendo 3% de álcool poli vinílico (Mowiol® 40-88, Aldrich Chemicals) como tensoativo, e homogeneizada a fim de formar a emulsão múltipla água/óleo/água (A/O/A). O solvente orgânico foi eliminado por evaporação à temperatura ambiente sob agitação moderada (500 rpm) com o auxílio de um homogeneizador Eurostar (IKA® - Labortechnik, Germany) por 6 horas. As microesferas foram coletadas por centrifugação a 15.000 x g em centrífuga Himac CR21 (Hitachi, rotor R20A2), lavadas 3 vezes com água estéril e livre de endotoxinas, liofilizadas por 24 horas (liofilizador Edwards) e armazenadas a 4°C. A formulação das vacinas foi inteiramente realizada em ambiente estéril (Cabine com Fluxo Laminar) e utilizou-se material descartável ou previamente tratado para a remoção de endotoxinas. Para a detecção da

quantidade de endotoxina as partículas foram reconstituídas em água (livre de endotoxinas) e mantidas sob forte agitação por 1 hora até o seu uso no teste de LAL.

### **3.4 - Avaliação da eficiência do encapsulamento da proteína recombinante em microesferas**

A taxa de encapsulamento da proteína recombinante foi determinada adicionando-se, em tubos tipo eppendorf, cerca de 3 mg de microesferas e 1 mL de acetonitrila. As amostras foram incubadas em banho de ultrassom 3210 (Branson) por 20 minutos para permitir a solubilização das microesferas. Após a solubilização, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o sedimento diluído em água destilada. A proteína recombinante foi quantificada por densitometria em gel de poliacrilamida. Para isso a densidade das bandas obtidas após a corrida da proteína extraída das formulações vacinais foi comparada com a densidade das bandas obtidas a partir de uma curva padrão de BSA aplicada no mesmo gel de poliacrilamida.

### **3.5 - Determinação da distribuição de diâmetro das microesferas**

A distribuição de diâmetro das partículas foi determinada por difratometria laser utilizando o LA-900 (HORIBA Instruments) ou o SALD (SHIMADZU Instruments). O tamanho médio das partículas foi expresso como o diâmetro médio em volume ( $D_{4,3}$ ). A polidispersidade foi dada pelo índice *span* o qual foi calculado por  $[(D_{0,9}-D_{0,1})/D_{0,5}]$ , onde  $D_{0,9}$ ,  $D_{0,5}$  e  $D_{0,1}$  são, respectivamente, os diâmetros de partícula correspondentes a 90, 50 e 10 % da distribuição acumulada.

### **3.6 - Ensaio de liberação *in vitro***

As microesferas foram ressuspensas em PBS e, em seguida, mantidas sob agitação constante a 37°C. Foram retiradas alíquotas em intervalos de tempo pré-estabelecidos e a proteína liberada no sobrenadante foi dosada por espectrofotometria como descrito no item 3.2. Para cada alíquota retirada um volume equivalente de PBS foi repostado a fim de manter durante todo o ensaio a mesma condição de dissolução (condição SINK).

### **3.7 - Animais**

Foram utilizados camundongos BALB/c, pesando entre 18-20 gramas, provenientes do Biotério de Animais Isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto -USP. Os

animais infectados foram mantidos no laboratório de biossegurança classe 3 (P3) em isoladores especiais.

### **3.8 - Imunizações**

#### ***3.8.1 - Imunizações com a proteína Hsp65 encapsulada em microesferas***

Camundongos BALB/c (n=8) receberam 5 mg de microesferas contendo Hsp65 recombinante e/ou adjuvante, por via intramuscular. Três dos animais vacinados foram mortos 30 e 90 dias após a imunização para o estudo de imunogenicidade e 5 foram infectados com *M. tuberculosis* H37Rv por via intratraqueal para os estudos de proteção.

#### ***3.8.2 - Delineamento dos grupos experimentais***

Os animais foram imunizados com as formulações segundo os esquemas descritos:

Experimento A: microesferas contendo ou não a proteína recombinante purificada pelo protocolo 1 (proteína com menor grau de pureza – Hsp65 a)

Grupo 1	Salina
Grupo 2	Microesferas não carregadas (vazia)
Grupo 3	Microesferas contendo KLK
Grupo 4	Microesferas contendo Poliarginina
Grupo 5	Microesferas contendo Hsp65 recombinante
Grupo 6	Microesferas contendo Hsp65 recombinante e KLK
Grupo 7	Microesferas contendo Hsp65 recombinante e Poliarginina

Experimento B: Microesferas contendo ou não a proteína recombinante purificada pelo protocolo 2 (proteína com maior grau de pureza – Hsp65 b)

Grupo 1	Salina
Grupo 2	Microesferas vazia
Grupo 3	Microesferas contendo KLK
Grupo 4	Microesferas contendo Poliarginina
Grupo 5	Microesferas contendo CpG
Grupo 6	Microesferas contendo Hsp65 recombinante
Grupo 7	Microesferas contendo Hsp65 recombinante e KLK
Grupo 8	Microesferas contendo Hsp65 recombinante e Poliarginina
Grupo 9	Microesferas contendo Hsp65 recombinante e CpG

### **3.9 - Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem de anticorpos**

Os títulos de anticorpos foram determinados nos soros pré-ímmunes e em soros coletados 15, 30, 60 e 90 dias após imunização por ensaio imunoenzimático (ELISA). Placas de poliestireno (Maxisorp Nunc-Immuno plates) de 96 poços, foram recobertas com 0,1 mL de solução da proteína Hsp65 recombinante (5 µg/mL) em tampão de ligação (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 14,3,mM, NaHCO<sub>3</sub> 10,3 mM NaN<sub>3</sub> 0,02%, pH 9,6), e incubadas durante a noite, a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas (0,05% de Tween 20 em PBS) e bloqueadas por 1 hora a 37°C (5% de soro bovino fetal em PBS). Após lavagem, foram adicionadas as amostras (soros diluídos seriadamente) que foram incubadas por 2 horas, a 37°C. Após lavagem, anti-IgG de camundongo (B7022 / Sigma, St Louis, USA), anti-IgG1 e anti-IgG2a conjugados a biotina (A85-1 e R19-15 respectivamente, Pharmingen, San Diego, CA, USA) foram adicionados para detecção de anticorpos específicos. Após lavagem, as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos com os reagentes A e B do kit StreptAB (Dako). Para detecção dos anticorpos, o substrato OPD (Sigma, St Louis, USA) foi adicionado; a reação foi finalizada pela adição de 50 µL de uma solução a 16% de ácido sulfúrico. A leitura da absorbância foi realizada em 490nm em leitor de ELISA. O título de anticorpos foi definido como a maior diluição do soro que apresenta valor de absorbância de 0,5.

### **3.10 - Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção das citocinas**

Células totais do baço de animais vacinados foram re-estimuladas *in vitro* por 48 horas, (com Concanavalina A, 20 µg/mL, ou proteína rHsp65a ou rHsp65b, 10 µg/mL, diluídas em meio RPMI contendo polimixina B, 30 µg/mL) para dosagem dos níveis de citocinas nos sobrenadantes de cultura. Para isso placas de 96 poços foram recobertas com a solução de ligação contendo o anticorpo purificado, diluído 1:1000 em tampão, e incubadas durante a noite, a 4°C. Após incubação, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20. O bloqueio das ligações inespecíficas foi feito com PBS contendo 5% de soro bovino fetal, incubando-se por 1 hora à temperatura ambiente. Novamente as placas foram lavadas como descrito acima. As amostras e o padrão utilizado na construção da curva foram diluídos em tampão de bloqueio contendo 0,05% de Tween 20. Após a adição das amostras e do padrão, as placas foram incubadas durante a noite, a 4°C. Após essa incubação as placas foram lavadas e foi adicionado o anticorpo anti-interleucina biotilado diluído 1:1000 (PharMingen) em tampão de bloqueio contendo 0,05% de Tween 20. Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente as

placas foram lavadas e foram incubadas à temperatura ambiente por mais 30 minutos com os reagentes A e B do kit StreptAB (Dako). Para detecção das citocinas, o substrato OPD (Sigma, St Louis, USA) foi adicionado; a reação foi finalizada pela adição de 50 µL de uma solução a 16% de ácido sulfúrico. A leitura foi feita em leitor de ELISA a 490nm.

### **3.11 - Avaliação da expressão de marcadores de superfície por citometria de fluxo**

As populações de células do baço ou pulmão de animais imunizados e/ou desafiados foram caracterizadas pela expressão de marcadores de superfície celular utilizando-se anticorpos conjugados a fluoróforos. Após a lise de hemáceas, o número de células nas suspensões provenientes dos órgãos citados foi acertado para  $1 \times 10^7$  células/mL em PBS. A seguir, 100 µL de cada suspensão celular foram distribuídos em tubos FACS. As células foram, então, incubadas com anticorpo anti-CD16/CD32 (Fc Block<sup>TM</sup> - PharMingen) na concentração de  $0,5 \mu\text{g}/10^6$  células durante 45 minutos, a 4°C para evitar a ocorrência de ligações inespecíficas. Posteriormente, as células foram incubadas com os respectivos anticorpos monoclonais de interesse ( $0,5 - 0,75 \mu\text{g} / 10^6$  células) durante 30 minutos, a 4°C, no escuro. Após incubação, as células foram lavadas com PBS contendo 2% de soro bovino fetal por tubo, sendo o precipitado celular coletado através de centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e o sedimento celular ressuspenso em 500 µL de PBS contendo 1% de formaldeído, para a fixação das células. As preparações celulares foram adquiridas no FACSsort (Becton & Dickinson), tendo sido coletados 10.000 eventos por amostra. Dentre as moléculas a avaliadas incluem-se CD4, CD8 e CD44.

### **3.12 - Determinação da viabilidade das cepas micobacterianas**

As cepas de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC-27294), armazenadas a -70°C, foram repicadas em meio líquido 7H9 enriquecido com Middlebrook ADC (BD Biosciences, Sparks, USA) e incubadas a 37°C, por 6 a 7 dias para o crescimento bacteriano. A suspensão micobacteriana foi centrifugada a 3500 rpm por 15 a 20 minutos e o sedimento ressuspenso em 2,0 mL de PBS estéril. A 100 µL desta suspensão foram adicionados 100 µL de diacetato de fluoresceína ( $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) e 100 µL de brometo de Etidium ( $10 \text{ mg}/\text{mL}$ ) (McDonough & Kress, 1995). As micobactérias foram incubadas a 37°C por 10 minutos e a viabilidade foi determinada em microscopia de fluorescência (Leica). As micobacterias com viabilidade superior a 80% foram filtradas em pré-filtro com poro de 8 a 10 µm (Millipore), para desfazer grumos. Ao material filtrado foi adicionado PBS estéril para ajustar a leitura da densidade ótica da suspensão de bactérias correspondente a concentração de  $5 \times 10^6$  bacilos/mL. Como

controle uma alíquota do inóculo utilizado na infecção foi plaqueado em meio de cultura 7H11.

### **3.13 - Infecção desafio com *M. tuberculosis* H37Rv**

Os animais previamente imunizados há 30 ou 90 dias foram anestesiados por via intra-peritoneal com 200 µL de tribromoethanol 2,5% (Acros Organics) e a traquéia foi exposta para a administração de 100 µL da suspensão de  $5 \times 10^6$  bacilos/mL.

### **3.14 - Determinação do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)**

Trinta dias após o desafio, os animais foram mortos e os pulmões pesados, cortados em pequenos fragmentos e transferidos para um tubo de 50 mL contendo 15 mL da solução de digestão (Liberase 6 µg/µL em RPMI 0,5 µg/mL) para cada amostra e, em seguida, incubados a 37°C, sob agitação constante, durante 30 minutos. Após a incubação, as células foram dispersas com o auxílio de uma seringa de 10 mL e, em seguida, foram retiradas alíquotas para o ensaio de unidade formadora de colônia (UFC). As suspensões de células foram diluídas de forma seriada e 200 µL foram plaqueados em meio 7H11. O número de unidades formadoras de colônias foi avaliado após incubação a 37°C por 3 a 4 semanas. Para confirmar que as colônias contadas eram de micobactérias algumas delas foram colhidas diretamente da placa, coradas pela técnica de Ziehl Neelsen e observadas ao microscópio óptico.

### **3.15 – Análise histopatológica do pulmão**

Trinta dias após o desafio, os animais foram sacrificados e fragmentos dos pulmões foram fixados com 10 mL de solução de formol tamponado 10%. Cortes dos pulmões foram corados por hematoxilina e eosina (HE) e pela técnica de Ziehl Neelsen e observadas ao microscópio óptico. A análise das lâminas foi feita com o auxílio do Professor Dr. Edson Garcia Soares do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

### **3.16 – Estudo da migração celular: bolha de ar**

Após sedação, animais da linhagem BALB/c ( $n = 3$ ) receberam uma injeção de 5 mL de ar estéril na região dorsal no primeiro dia do experimento e no quarto dia receberam mais 3 mL de ar. No sexto dia, foi injetado nas bolhas 1mg das formulações e, no sétimo dia os animais foram sacrificados. As células foram obtidas do lavado da bolha com o auxílio de um cateter acoplado a uma seringa contendo 3 mL de solução de PBS estéril. As células assim

obtidas foram contadas por meio da coloração com a solução de azul de Trypan 0,1% em câmara de Neubauer (diluição 1:5). A contagem diferencial das células presentes nos lavados foi realizada em esfregaços preparados em citocentrífuga e corados pelo corante Rosenfeld, sendo contadas 100 células em diferentes campos, com aumento de 100x conforme já descrito por Faccioli e colaboradores (1990 e 1991).

### **3.17- Análise estatística**

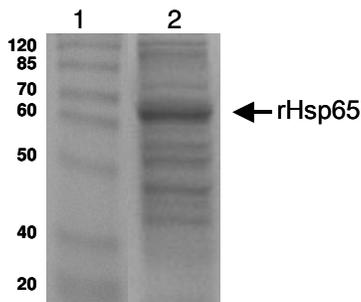
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Para a comparação dos resultados obtidos foi utilizado o teste Tukey após a análise de variância ANOVA. Foram consideradas estatisticamente significantes as diferenças com  $p < 0,05$ . Nos ensaios de proteção foram consideradas significativas as reduções de 100 vezes em relação ao animal não imunizado e desafiado. Este valor é determinado em função da proteção que o BCG promove em BALB/c, reduzindo a carga micobacteriana cerca de 100 vezes.

## **4. RESULTADOS**

#### 4.1 – Obtenção da proteína Hsp65 recombinante para o preparo das formulações vacinais

##### 4.1.1 –Purificação da Hsp65 recombinante (Hsp65a) e remoção do LPS pela técnica de separação de fases com Triton X-114

A proteína recombinante utilizada em nossos experimentos vinha sendo purificada por um sistema simples de precipitação com sulfato de amônio gerando um produto com contaminantes protéicos e altos níveis de contaminação por endotoxina. Conforme pode ser observado na Figura 1 a solução de proteína Hsp65 recombinante mostrava-se pouco purificada não só pela presença de outras bandas de proteína como também pelos níveis de endotoxina detectados por meio do teste de LAL. Entretanto, registros mais antigos do laboratório mostravam que, inicialmente, a proteína Hsp65 recombinante tinha uma expressão melhor se comparada à atual (dados não mostrados). Apesar dos estudos terem sido iniciados com a proteína pouco purificada (Hsp65a), paralelamente, fomos trabalhando para a remoção desses contaminantes. A primeira estratégia utilizada para a remoção de endotoxinas da solução da proteína Hsp65 foi a técnica de separação de fases usando o detergente Triton X-114 (AIDA & PABST, 1990). A quantidade de LPS presente na solução de proteína, expressa em Unidades de Endotoxina (UE) por  $\mu\text{g}$  de proteína, foi reduzida em cerca de 100 vezes após esse tratamento, passou de 50 UE/ $\mu\text{g}$  de proteína para 0,5 UE/ $\mu\text{g}$ . Apesar de remover a endotoxina de forma eficiente houve uma grande perda de proteína Hsp65a, sendo esta proporcional à perda das proteínas contaminantes, ou seja, o tratamento com Triton X-114 não aumentou a pureza da proteína Hsp65a.



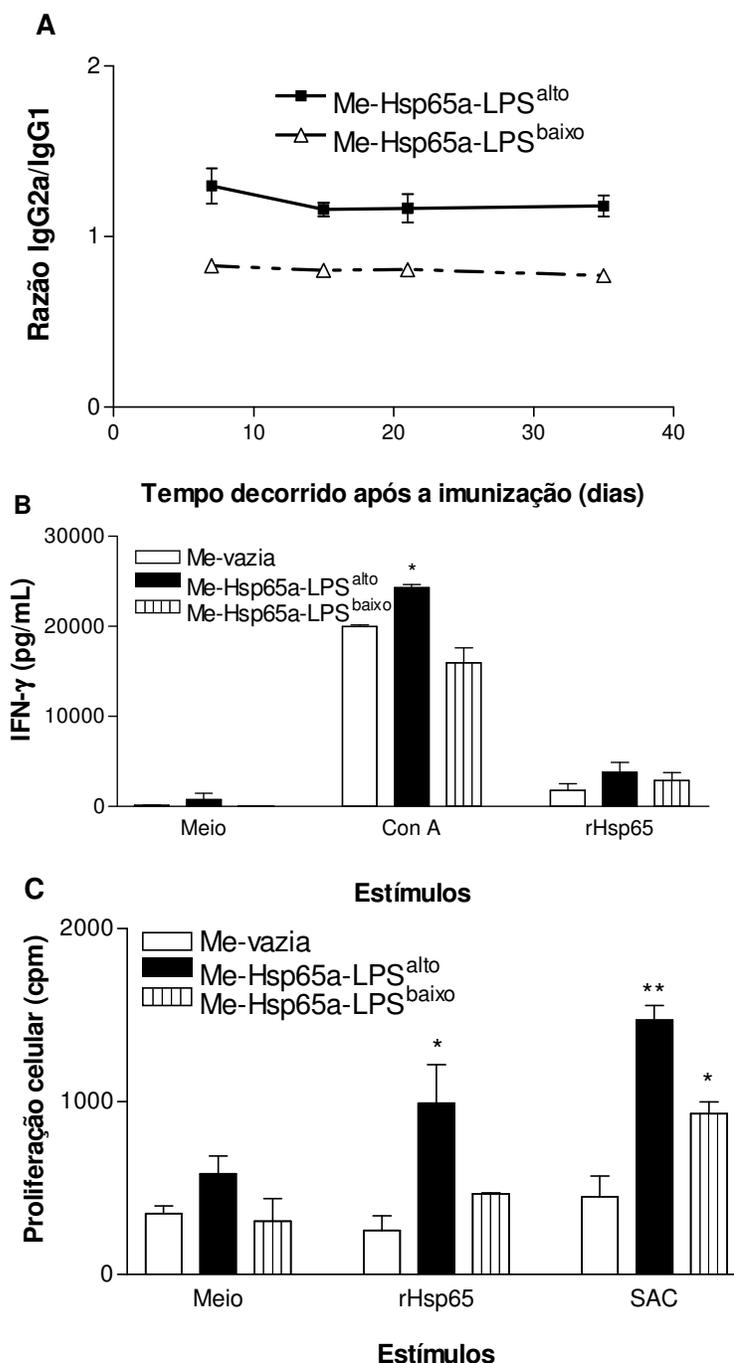
**Figura 1: Proteína Hsp65a.** Gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE) mostrando a proteína Hsp65 recombinante (seta). Bactérias *E. coli* BL21, transformadas com o plasmídeo PIL161 contendo o gene da Hsp65, foram cultivadas em caldo LB (contendo 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina) e quando a D.O.<sub>600nm</sub> atingiu 0,6 a expressão da proteína foi induzida pela adição de IPTG para a concentração final de 1mM. Após 18 horas de incubação a 37°C e sob agitação constante de 250 rpm a biomassa de bactérias foi concentrada por centrifugação para purificação da proteína. A proteína Hsp65 foi expressa na forma de corpos de inclusão e a sua purificação foi feita em condições desnaturantes por precipitação com sulfato de amônio. Canaletas: 1) Padrão de peso molecular (kDa); 2) Amostra de rHsp65 purificada.

#### 4.1.2 – Resposta imune induzida após a vacinação com formulações contendo

##### *Hsp65a tratada com Triton X-114*

A proteína obtida após o tratamento com o Triton X-114 foi utilizada para preparar formulações de microesferas as quais foram utilizadas em estudos de imunogenicidade. Para isso camundongos BALB/c receberam uma injeção em dose única de 5 mg das formulações de microesferas contendo a proteína tratada com Triton X-114 (0,98 µg de Hsp65/mg) ou sem tratamento (1,05 µg/mg). A formulação contendo a proteína tratada apresentou uma menor quantidade de LPS (1,05 EU/mg de formulação) e foi chamada de Me-Hsp65-LPS<sup>baixo</sup>. A formulação contendo a proteína sem tratamento apresentou maior quantidade de LPS (>105 EU/mg de formulação) e foi denominada Me-Hsp65-LPS<sup>alto</sup>. Nossos resultados mostraram que a remoção parcial do LPS promoveu uma mudança significativa na resposta imune específica induzida por formulações de microesferas contendo essa proteína. A razão IgG2a/IgG1 para a formulação com maior quantidade de LPS mostrou uma resposta mais polarizada para o padrão Th1 em relação à proteína menos contaminada pela endotoxina (Figura 2A). A produção de IFN-γ inespecífica, mas não a específica, e a proliferação celular frente a ambos os estímulos foram significativamente maiores nos animais que receberam Me-Hsp65-LPS<sup>alto</sup>, Figuras 2B e 2C. Esses resultados confirmam que o LPS é capaz de exercer um efeito inespecífico (adjuvante) sobre a resposta imune e justificam, portanto, a sua remoção ou redução nas soluções de proteína utilizadas em formulações vacinais.

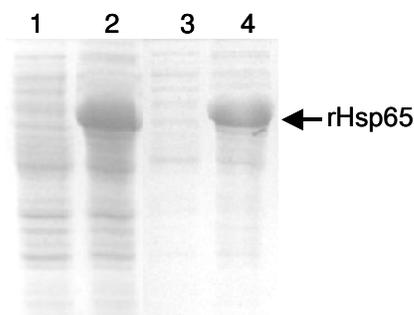
Apesar da técnica de purificação com detergente ser eficiente na redução do LPS da solução de Hsp65, a completa remoção do detergente desta solução não foi alcançada. Para tentar remover a quantidade residual de Triton X-114 utilizou-se uma resina com afinidade pelo detergente e filtração tangencial, porém, nenhuma das metodologias foi eficaz na remoção. A presença do detergente na solução de proteína impossibilitou o seu uso *in vitro*, para re-estimular células em cultura, devido à toxicidade celular. Desta forma, diante da toxicidade *in vitro*, da perda de cerca de metade da proteína após o tratamento com o triton X-114 e da baixa pureza da proteína purificada buscou-se uma nova estratégia para a expressão e purificação da Hsp65.



**Figura 2: Resposta imune induzida após a vacinação com microesferas contendo Hsp65a-LPS<sup>alto</sup> ou Hsp65a-LPS<sup>baixo</sup>.** A) Razão IgG2a/IgG1, calculada a partir dos títulos de anticorpos anti-Hsp65a determinados por ELISA. B) Produção de IFN- $\gamma$ ; C) Proliferação celular. Células do baço de animais vacinados com formulações de microesferas contendo Hsp65a-LPS<sup>alto</sup> ou Hsp65a-LPS<sup>baixo</sup>, obtidas após 35 dias da vacinação, foram re-estimuladas *in vitro* com Con A, *Staphylococcus aureus* (SAC) ou a proteína rHsp65a com alta contaminação por LPS. As formulações apresentaram a seguinte quantidade de LPS: formulação vazia 0,059 UE/mg e a formulação contendo a Hsp65-LPS<sup>alto</sup> >105 UE/mg e a formulação contendo a Hsp65-LPS<sup>baixo</sup> 1,052 UE/mg. E o tamanho médio das partículas foi de 4,19, 5,57 e 8,82  $\mu$ m, respectivamente.

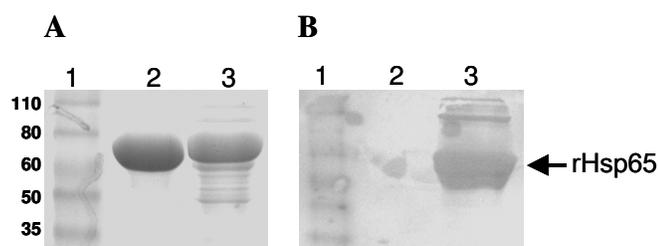
#### 4.1.3 –Obtenção da Hsp65 recombinante (Hsp65b): clonagem do gene da Hsp65 de *M. leprae* no vetor pET28a , expressão e purificação da proteína recombinante

A fim de melhorar a purificação utilizando técnicas cromatográficas, o gene da proteína Hsp65 foi clonado no vetor de expressão pET28a, que insere uma cauda de histidina na proteína a ser expressa, possibilitando sua purificação por cromatografia de afinidade por metal. Após a obtenção de um clone bacteriano com o gene da proteína de interesse foi feito o sequenciamento do gene da Hsp65. Por meio da sua amplificação com *primers* específicos obteve-se uma sequência gênica homóloga à sequência original da Hsp65 de *M. leprae* e o clone dessa sequência foi considerado adequado para a purificação da proteína recombinante. Com esse clone de bactérias foi preparado um banco de células de referência (BCR) e um banco de trabalho (BCT) os quais foram armazenados em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, foram feitos testes para avaliar a expressão da proteína recombinante e para ajustar as condições de temperatura, concentração do indutor de expressão (IPTG) e do tempo para a indução da expressão. Na Figura 3 foram mostrados os níveis do produto expresso após indução da cultura bacteriana por 18 horas a  $30^{\circ}\text{C}$  com 300mM de IPTG, melhor condição de expressão. Pode-se observar que a proteína foi expressa em altos níveis e está concentrada na porção insolúvel (corpos de inclusão), já que está presente no sedimento do lisado da cultura de bactérias, o que faz necessária a utilização de condições desnaturantes para a purificação da proteína.



**Figura 3: Proteína rHsp65b.** Gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) mostrando a expressão da proteína Hsp65 (seta). Bactérias *E. coli* ER2566, transformadas com o plasmídeo pET28a contendo o gene da Hsp65, foram cultivadas em caldo LB (contendo 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de canamicina) e quando a D.O.<sub>600nm</sub> atingiu 0,6 a expressão da proteína foi induzida pela adição de IPTG para a concentração final de 0,3mM. Após 18 horas de incubação a  $30^{\circ}\text{C}$  e sob agitação constante de 250 rpm a biomassa de bactérias foi concentrada por centrifugação para purificação da proteína. A proteína (Hsp65b) foi expressa na forma de corpos de inclusão e a sua purificação foi feita em condições desnaturantes. Neste gel são mostrados apenas os produtos obtidos após a lise e solubilização da biomassa de bactérias (sobrenadante e sedimento do lisado). Canaletas: 1) Amostra do crescimento bacteriano antes da indução, 2) Amostra do crescimento bacteriano após a indução; 3) Sobrenadante do lisado de bactérias e 4) Sedimento do lisado de bactérias.

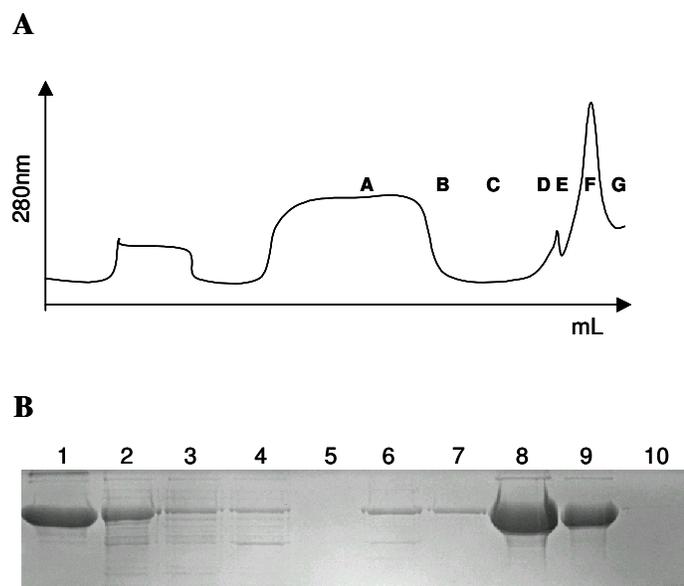
A identidade da proteína expressa foi confirmada por meio de um *immunoblotting*. A Figura 4 mostra uma banda de peso molecular aproximado de 65kDa, a qual foi reconhecida pelo anticorpo específico para Hsp65 (CL44). A especificidade da revelação foi demonstrada pela observação de que a banda da proteína BSA mostrada na Figura 4A não foi identificada em 4B pelo anticorpo específico.



**Figura 4: Identificação da proteína rHsp65b.** A) Gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) corado por comassie e B) *Imunoblotting*. As amostras foram aplicadas em dois géis de poliacrilamida 10% e após a corrida eletroforética um dos géis foi corado por Coomassie Blue e o outro foi transferido para uma membrana a qual foi incubada com o anticorpo anti-Hsp65 (CL44) para a identificação da proteína recombinante. 1) Padrão de peso molecular (kDa); 2) 8  $\mu$ g de BSA; 3) Produto expresso (Hsp65) antes da purificação por cromatografia.

Após a caracterização inicial da proteína foram estabelecidas as condições para a sua purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando a técnica de afinidade por metal em coluna HiTrap (HiTrap chelating, GE Healthcare). Assim, a biomassa de bactérias obtida após a indução da expressão de Hsp65 foi lisada em homogeneizador de alta pressão, solubilizada em tampão fosfato contendo 5 M de uréia e 5 mM de imidazol e essa amostra foi utilizada na purificação da Hsp65b por cromatografia. Como o objetivo principal foi o de obter uma proteína com quantidades reduzidas de endotoxinas (LPS), então os cuidados durante a purificação foram intensificados. Os tampões foram preparados com água livre de endotoxinas e em recipientes previamente despirogenizados. A matriz da coluna cromatográfica e o sistema de tubos do cromatógrafo (AKTA Purifier, GE Healthcare) também foram despirogenizados antes da aplicação da amostra. Durante as etapas da purificação foram recolhidas alíquotas para análise em gel de acrilamida. Conforme apresentado na Figura 5A a fração A representa a parcela de proteínas que não se ligou à matriz durante a aplicação da amostra (Figura 5B canaleta 3). A fração B corresponde ao início da etapa de lavagem da coluna com o tampão fosfato contendo 5 M de uréia e 5 mM de imidazol (Figura 5B, canaleta 4) e a fração C, ao final dessa etapa (Figura 5B, canaleta 5). As frações D e E correspondem à eluição de proteínas que se ligam mais fracamente à resina, pela passagem de um tampão fosfato contendo 5 M de uréia e 50 mM de imidazol (Figura 5B,

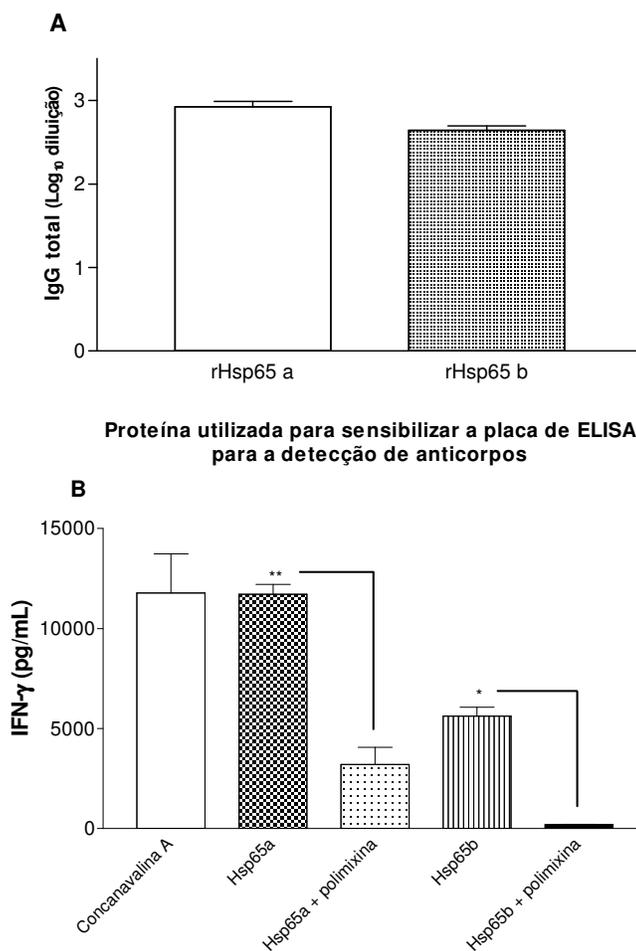
canaletas 6 e 7). A fração F representa a Hsp65 eluída com o tampão fosfato contendo 5 M de uréia e 300 mM de imidazol (Figura 5B, canaletas 8 e 9). A fração G corresponde ao final da eluição da proteína de interesse. Pode-se observar ainda que, após a cromatografia, a amostra da proteína purificada apresentou-se mais concentrada e os principais contaminantes foram eliminados (Figura 5B, canaletas 8 e 9). Após a diálise da fração F contra água livre de endotoxina, a solução de proteína foi submetida ao teste de LAL para determinação da quantidade de endotoxina (UE). O lote de proteína utilizado para o encapsulamento em microesferas apresentou 1UE/ $\mu\text{g}$  de proteína. A quantidade de endotoxina na solução de proteína antes da purificação era  $>100$  EU/ $\mu\text{g}$ . Assim, após a cromatografia houve uma redução de endotoxina de pelo menos 100 vezes. A concentração de proteínas totais foi determinada utilizando-se o reagente de Coomassie Blue.



**Figura 5: Passos da purificação da proteína rHsp65b.** A) Cromatograma representativo da purificação da Hsp65 por CLAE (cromatografia de afinidade) e B) Gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) mostrando os produtos obtidos na corrida cromatográfica para a purificação da Hsp65. A proteína solubilizada em um tampão fosfato contendo 5 M de Uréia e 5 mM de Imidazol (T) foi aplicada na coluna cromatográfica e após dois passos de lavagem, com T seguido de um tampão fosfato contendo 5 M de Uréia e 50 mM de Imidazol (T1), a proteína recombinante foi eluída da coluna com um tampão fosfato contendo 5 M de Uréia e 300 mM de Imidazol (T2). Canaletas: 1) 10  $\mu\text{g}$  de BSA; 2) Sedimento do lisado de bactérias; 3) Fração A; 4) Fração B; 5) Fração C; 6) Fração D; 7) Fração E; 8) Fração F; 9) Fração F diluída 2 vezes e 10) Fração G da corrida cromatográfica esquematizada em A.

#### ***4.1.4 – Comparação das respostas às proteínas rHsp65a e rHsp65b utilizadas em ELISA para detecção de anticorpos e como estímulo para culturas “in vitro”***

Para verificar se a proteína obtida com a nova construção plasmideal poderia substituir a antiga sem prejuízo para as avaliações da resposta imune humoral e celular, além da caracterização da proteína em gel de poliacrilamida, também foi analisada a sua imunogenicidade. Conforme foi mostrado na Figura 6A, a utilização da proteína mais purificada (Hsp65b) para sensibilizar placas de ELISA para a detecção de anticorpos anti-Hsp65 gerou resultados similares àqueles obtidos quando se utilizou a proteína menos purificada (Hsp65a). A proteína purificada também foi utilizada para re-estimular culturas *in vitro*, para a detecção de IFN- $\gamma$ . Conforme pode ser observado na Figura 6B a proteína Hsp65a estimulou uma resposta inespecífica comparável àquela induzida pela concanavalina A (um estimulante policlonal clássico). Nesta mesma figura mostrou-se que a remoção parcial da endotoxina (Hsp65b) minimizou esse efeito inespecífico. A utilização de polimixina B, um antagonista do LPS, em conjunto com ambas as proteínas (Hsp65a ou Hsp65b) também reduziu significativamente a inespecificidade das respostas induzidas por elas. Assim, a proteína Hsp65b passou a ser utilizada para re-estimular as culturas *in vitro* na presença de polimixina B. Vale ressaltar ainda que, em um outro experimento confirmou-se a especificidade da resposta detectada. Nesse experimento, apenas células do baço de animais vacinados com DNA-Hsp65 responderam frente à re-estimulação com a proteína quando comparada com a resposta do grupo controle, que recebeu salina (não mostrado). Após a análise desses resultados passou-se a utilizar a proteína purificada da nova construção plasmideal (Hsp65b) nos ensaios de culturas e nos experimentos *in vivo*.

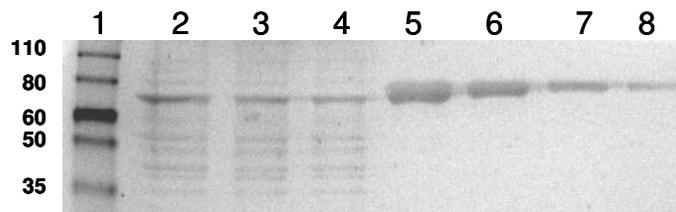


**Figura 6: Comparação da resposta às proteínas rHsp65a e rHsp65b em ELISA e culturas “in vitro”.** A) Título de anticorpos anti-Hsp65 de um soro padrão determinado por ELISA, utilizando-se para sensibilizar a placa a proteína Hsp65a (menos purificada) ou Hsp65b (mais purificada). B) Nível de IFN- $\gamma$  induzido após cultura de células do baço na presença de Concanavalina A ou das proteínas rHsp65a ou rHsp65b, na ausência ou presença de polimixina B (30  $\mu$ g para  $5 \times 10^6$  células em cultura). Animais BALB/c foram vacinados com microesferas contendo proteína Hsp65a e após 35 dias da imunização foram mortos. As células do baço foram utilizadas para a cultura celular e re-estimulação *in vitro* e o soro foi utilizado para a detecção de anticorpos. \*  $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,001$ , diferença em relação ao respectivo controle, sem polimixina. Hsp65a e Hsp65b também foram estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

## **4.2 - Formulação de vacinas contendo Hsp65a ou Hsp65b e adjuvantes encapsulados em microesferas biodegradáveis: caracterização das formulações e estudo da imunogenicidade**

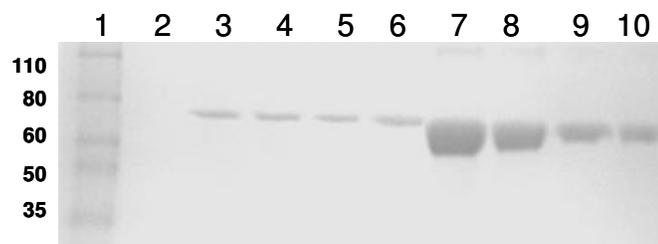
### ***4.2.1- Caracterização das formulações vacinais***

As formulações vacinais foram obtidas conforme descrito no item 3.3 onde, resumidamente, a proteína Hsp65 e/ou os adjuvantes (Poliarginina, KLK ou CpG 1668) foram encapsulados em microesferas de PLGA 50:50. O primeiro passo após a formulação das vacinas com as proteínas Hsp65a (menos purificada, contendo cerca de 50 EU de endotoxina por  $\mu\text{g}$  de proteína) ou Hsp65b (mais purificada, contendo cerca de 1 EU de endotoxina por  $\mu\text{g}$  de proteína) foi a sua caracterização, quanto à quantidade de proteína encapsulada e ao tamanho das partículas. Inicialmente, a quantificação da proteína encapsulada foi feita por espectrofotometria utilizando-se o reagente Comassie para ensaios com proteínas (método de Bradford). Entretanto, esse método de doseamento não foi eficiente para a quantificação da proteína co-encapsulada com os adjuvantes. As leituras da absorbância de amostras contendo apenas o adjuvante foram superiores às leituras de amostras contendo o adjuvante e a proteína, sugerindo que os adjuvantes interferiram no doseamento. Diante disso, as mesmas amostras utilizadas para o doseamento da proteína por espectrofotometria, foram aplicadas em gel de acrilamida para a corrida eletroforética. Como mostrado nas Figuras 7 e 8, após a solubilização das microesferas em acetonitrila, a proteína recombinante Hsp65 foi eficientemente extraída da matriz polimérica e pode ser visualizada em gel. Nas canaletas 2, 3 e 4 do gel de poliácridamida (Figura 7) observou-se a banda de Hsp65a. Esse resultado mostra que a proteína foi encapsulada nas microesferas de PLGA. Apesar de não ter sido quantificada pela técnica de Bradford, a análise do gel por densitometria revelou que quantidades similares da proteína (considerando apenas a banda da Hsp65) foram encapsuladas nas três formulações (cerca de  $1\mu\text{g}/\text{mg}$  de partícula). Nesse mesmo gel aparecem algumas outras bandas de peso molecular menor que o da proteína de interesse. Essas bandas correspondem às proteínas contaminantes remanescentes do processo de purificação, conforme também mostrado na Figura 1. A eficiência do encapsulamento da proteína Hsp65a foi baixa e correspondeu a 20% para as diferentes formulações. As taxas de encapsulamento dos adjuvantes não foram determinadas, entretanto, como os adjuvantes foram solubilizados na mesma fase aquosa onde a proteína estava presente assumimos que os mesmos também foram encapsulados.



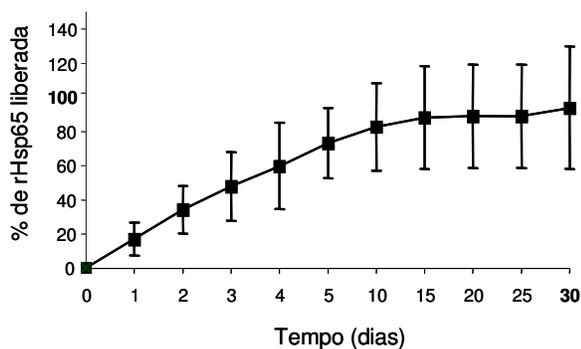
**Figura-7: *rHsp65a* extraída das formulações vacinais.** Gel de poliacrilamida 12,5% contendo SDS mostrando a proteína Hsp65 encapsulada na microesfera de PLGA. Amostras de Hsp65a obtidas após a solubilização de cerca de 3 mg das microesferas em acetonitrila, foram tratadas sob condições redutoras e, em seguida, foram aplicadas em canaletas no gel de poliacrilamida, submetidas à corrida eletroforética e coradas pelo método do nitrato de prata (NESTERENKO *et al*, 1994). Canaletas: 1) Padrão de peso molecular (kDa); 2) Microesfera contendo Hsp65a+KLK; 3) Microesfera contendo Hsp65a+Poliarginina; 4) Microesfera contendo Hsp65a; 5) 10 µg BSA; 6) 5 µg BSA; 7) 2 µg BSA e 8) 1 µg BSA.

Como mostrado na Figura 8, a proteína recombinante Hsp65b foi eficientemente extraída da matriz polimérica e pode ser visualizada nas canaletas 3, 4, 5 e 6 do gel de poliacrilamida. A análise do gel, por densitometria, revelou que quantidades similares da proteína foram encapsuladas nas quatro formulações (cerca de 1µg/mg de partícula). Esse resultado mostra que a proteína foi encapsulada nas microesferas de PLGA com uma eficiência cerca de 7%, menor que a observada para as formulações com a proteína Hsp65a. Cabe destacar aqui que a proteína extraída dessas formulações não apresentou bandas contaminantes como aquelas mostradas na Figura 7.



**Figura 8: *rHsp65b* extraída das formulações vacinais.** Gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) mostrando a proteína Hsp65b extraída da microesfera de PLGA. Amostras de Hsp65b obtidas após a solubilização das microesferas com acetonitrila foram tratadas sob condições redutoras e, em seguida, foram aplicadas em canaletas no gel de poliacrilamida, submetidas à corrida eletroforética e coradas com Coomassie Blue. Canaletas: 1) Peso molecular (kDa); 2) Microesfera vazia; 3) Microesfera contendo Hsp65b; 4) Microesfera contendo Hsp65b+Poliarginina; 5) Microesfera contendo Hsp65b+KLK; 6) Microesfera contendo Hsp65b+CpG; 7) 20 µg BSA; 8) 10 µg BSA; 9) 5 µg BSA e 10) 2 µg BSA.

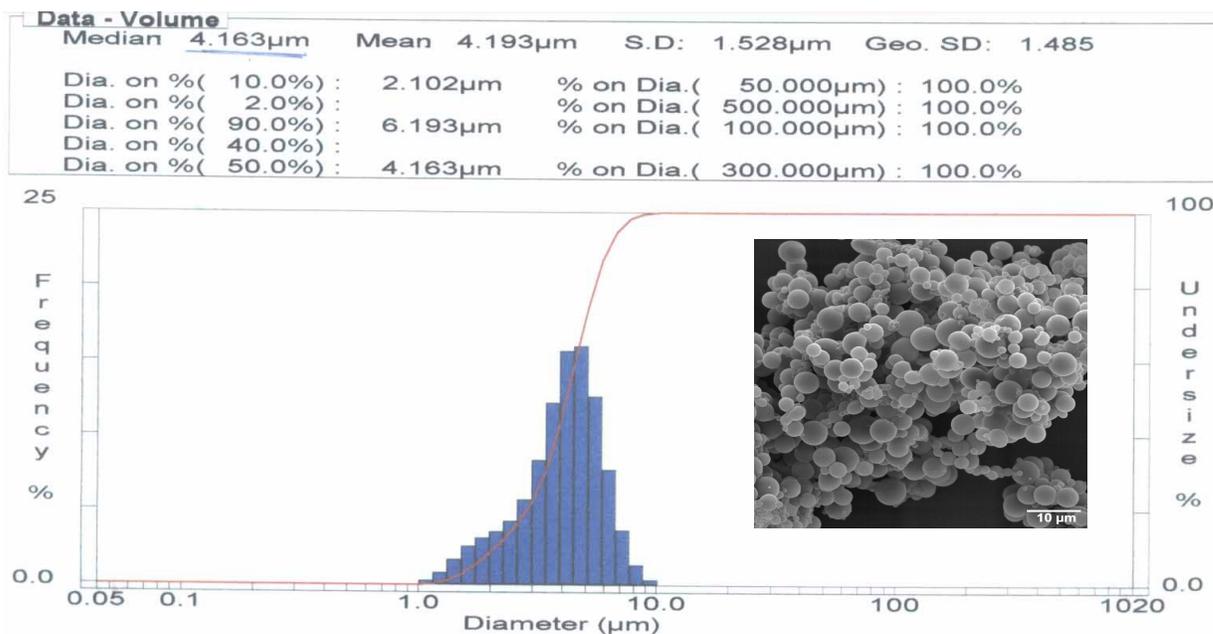
Outro estudo realizado foi o da liberação da proteína encapsulada *in vitro*. Como mostrado na Figura 9, a maior parte da proteína é liberada nos primeiros dias do ensaio e com o passar do tempo são liberadas quantidades cada vez menores até a liberação de toda a proteína encapsulada (30 dias). Assim que as partículas são reconstituídas em solução aquosa a fração de proteína adsorvida à superfície do polímero e parte da proteína encapsulada são liberadas por difusão simples através dos poros das partículas. Com o passar do tempo a matriz das microesferas sofre erosão por hidrólise dos polímeros que a constitui e, assim, novos canais se formam e a proteína encerrada na matriz é liberada por difusão. Os resultados mostram que, *in vitro*, a liberação do antígeno encapsulado pode ser sustentada por um intervalo de tempo de trinta dias. No sistema *in vivo* uma formulação que garanta a liberação sustentada do antígeno representa uma opção como vacina já que permite a aplicação do conceito de vacina de dose única. O tempo aproximado de biodegradação dessas microesferas de PLGA não foi avaliado, entretanto, dados da literatura revelam que é de cerca de 2 meses e está relacionado à proporção dos monômeros de ácido lático e glicólico, ao tamanho das cadeias desses polímeros e ao tamanho das partículas (LEWIS, 1990).



**Figura-9: Perfil de liberação da proteína Hsp65 recombinante encapsulada.** As microesferas de PLGA 50:50 foram ressuspensas em tampão fosfato e incubadas a 37°C sob agitação. Em intervalos de tempo pré-estabelecidos o sobrenadante foi recolhido e a quantidade de proteína foi doseada e representada como a quantidade liberada acumulada.

O tamanho das microesferas é um outro parâmetro de grande relevância na caracterização de formulações particuladas e foi determinado por difratometria laser. Os resultados obtidos da análise das microesferas fornecem dados sobre o seu diâmetro (média e mediana), bem como, a distribuição do tamanho dessas partículas. As partículas foram desenhadas para apresentar um tamanho entre 1 e 10  $\mu\text{m}$  e a análise das formulações por difratometria laser (Figura 10) mostrou que esse objetivo foi alcançado. Na micrografia mostrada na Figura 10, utilizando-se como parâmetro a escala de 10  $\mu\text{m}$ , esses resultados

foram visualmente confirmados, além disso, também foi possível visualizar o aspecto geral das partículas.



**Figura-10: Tamanho das microesferas de PLGA 50:50.** Diâmetro e frequência da distribuição do tamanho de partículas recém preparadas, determinados por difratometria laser utilizando o LA-900 (HORIBA Instruments). Em detalhe, dentro do gráfico, é apresentada uma micrografia eletrônica de varredura dessas microesferas (2000x).

Os resultados obtidos de gráficos semelhantes ao representado na Figura 10, mostraram que todas as formulações apresentaram uma distribuição normal do tamanho das partículas. Além disso, a maioria das formulações está numa faixa de tamanho inferior a 10 µm (Tabelas 1 e 2), isso garante a sua vetorização passiva para células fagocitárias. Nas Tabelas foram mostrados:  $D_{4,3}$ , que representa o tamanho médio da partícula (expresso como diâmetro médio em volume);  $D_{0,1}$ ,  $D_{0,5}$  e  $D_{0,9}$ , que representam, respectivamente, os diâmetros correspondentes a 10, 50 e 90 % da distribuição acumulada e Span que é o índice que representa a polidispersidade, calculada por  $[(D_{0,9} - D_{0,1})/D_{0,5}]$ . Este último é um parâmetro importante porque demonstra o quanto a distribuição de tamanho é larga. Em relação a esse parâmetro notou-se que as partículas mostradas na Tabela 1 apresentaram uma polidispersidade menor que aquela observada para a maioria das formulações apresentadas na Tabela 2. Isso significa que a faixa de distribuição de tamanho das partículas representadas na Tabela 1 é menor que aquela observada para as formulações descritas na Tabela 2.

Ainda nas Tabelas 1 e 2 foram mostrados os níveis de endotoxina detectados em cada formulação. Esse valor é resultante da quantidade de endotoxina encapsulada juntamente com

a proteína e/ou do processo de formulação da microesfera. Para a detecção de endotoxinas as partículas foram reconstituídas em solução aquosa e mantidas sob forte agitação por cerca de 1 hora até o momento do uso no teste de LAL. Com esse procedimento, a proteína adsorvida na superfície do polímero e parte daquela encerrada na matriz foi liberada para a solução aquosa, reproduzindo de forma acelerada as condições iniciais de liberação (Figura 9). Por isso considerou-se o período de 24 horas como sendo a referência para a endotoxina detectada pelo teste de LAL.

Conforme pode ser observado na Tabela 1, as formulações controles apresentaram níveis variados de endotoxinas porém menores que aqueles observados nas formulações contendo a proteína recombinante (Hsp65a). As formulações foram preparadas com a mesma quantidade de proteína (mesmo lote) e, conforme observado na Figura 7, quantidades similares da mesma foram encapsuladas. Assim, a quantidade de endotoxinas presentes nessas formulações, apesar de terem sido expressas como  $>105$  EU/mg, foram provavelmente similares. A Farmacopéia Européia preconiza que o limite de contaminação por endotoxina, para medicamentos administrados por via endovenosa, não ultrapasse 5EU/Kg peso corpóreo/hora. Assim, um camundongo com peso médio de 20g pode receber até 0,1EU/animal/hora. Os animais imunizados com 5 mg dessas formulações receberam entre 0,35-5,25 (controles) e  $>500$  EU/animal (formulações contendo Hsp65a). Para calcular a quantidade de EU/animal/hora considerou-se como referência o período de 24 horas para a liberação da endotoxina detectada, conforme justificado no parágrafo anterior. No caso das formulações controle, as quantidades de endotoxina foram 0,014, 0,062 e 0,218 EU/animal/hora, ou seja, uma das formulações (vazia) apresentou o dobro de endotoxina estabelecido como limite (0,1EU/animal/hora). Para as formulações contendo a Hsp65a os níveis de endotoxina administrados aos animais foram maiores que 20,83 EU/animal/hora. Assim, a quantidade de LPS presente nas formulações contendo a proteína recombinante Hsp65a foi 200 vezes maior que o limite preconizado pela Farmacopéia e a presença desse contaminante pode influenciar na resposta imune desencadeada.

Na Tabela 2 observamos que todas as formulações apresentaram quantidades menores que 1 EU de endotoxina por mg de microesfera. Os animais imunizados com 5 mg dessas formulações receberam entre 0,1 – 3,9 EU (controles) e 1,5 – 1,79 EU/animal (formulações contendo Hsp65b). A maioria das formulações controle (0,02; 0,016 e 0,04 EU/animal/hora) apresentou quantidade de endotoxinas abaixo do limite preconizado (0,1EU/animal/hora), entretanto, a formulação contendo a poliarginina apresentou 0,145 EU/animal/hora, 1,4 vezes acima do limite. As quantidades de endotoxina nas formulações contendo a proteína Hsp65b

estão abaixo do limite preconizado (5 EU/Kg/hora = 0,1 EU/animal (20g)/hora). Os animais vacinados com as formulações contendo Hsp65b receberam entre 0,06 e 0,074EU/animal/hora. Comparadas às formulações apresentadas na Tabela 1 as quantidades de endotoxina presentes nas formulações contendo a proteína Hsp65b foram muito menores (pelo menos 280 vezes) que aquelas detectadas nas formulações contendo a proteína recombinante menos purificada (Hsp65a).

**Tabela 1: Distribuição de tamanho das partículas e nível de contaminação por endotoxina.** O diâmetro e a frequência da distribuição do tamanho das partículas foram determinados por difratometria laser utilizando o LA-900 (HORIBA Instruments). O nível de contaminação das microesferas por endotoxinas foi determinado através do teste de LAL.

Formulações	Distribuição de tamanho das partículas ( $\mu\text{m}$ )*				Nível de endotoxina nas microesferas (UE/mg)
	D <sub>4,3</sub>	D <sub>0,1</sub>	D <sub>0,9</sub>	Span	
Microesfera - vazia	4,19	2,10	6,19	0,98	1,05
Microesfera - Poliarginina	6,35	4,41	8,51	0,66	0,31
Microesfera – KLK	5,60	3,64	7,78	0,76	0,07
Microesfera – Hsp65a	6,80	2,9	9,30	0,89	>105
Microesfera – Hsp65a+Poliarginina	4,94	3,04	7,30	0,91	>105
Microesfera – Hsp65a + KLK	4,47	2,66	8,34	1,25	>105

\* D<sub>4,3</sub> representa o tamanho médio da partícula (expresso como diâmetro médio em volume); D<sub>0,1</sub>, D<sub>0,5</sub> e D<sub>0,9</sub> representam, respectivamente, os diâmetros correspondentes a 10, 50 e 90 % da distribuição acumulada e Span é o índice que representa a polidispersidade, calculada por  $[(D_{0,9} - D_{0,1})/D_{0,5}]$ .

**Tabela-2: Distribuição de tamanho das partículas e nível de contaminação por endotoxina.** O diâmetro e a frequência da distribuição do tamanho das partículas foram determinados por difratometria laser utilizando o SALD-2101 (SHIMADZU). O nível de contaminação das microesferas por endotoxinas foi determinado através do teste de LAL.

Formulações	Distribuição de tamanho das partículas ( $\mu\text{m}$ )*				Nível de endotoxina nas microesferas (UE/mg)
	D <sub>4,3</sub>	D <sub>0,1</sub>	D <sub>0,9</sub>	Span	
Microesfera - vazia	4,78	3,28	7,47	0,83	0,111
Microesfera - Poliarginina	4,41	0,763	11,44	2,02	0,781
Microesfera – KLK	4,07	0,956	7,77	1,34	0,020
Microesfera - CpG	5,33	3,71	7,68	0,75	0,086
Microesfera – Hsp65b	3,89	0,78	8,99	1,66	0,304
Microesfera – Hsp65b+Poliarginina	4,50	0,86	9,74	1,68	0,358
Microesfera – Hsp65b+KLK	7,07	0,80	13,00	1,73	0,300
Microesfera – Hsp65b+CpG	5,10	3,81	6,70	0,57	0,313

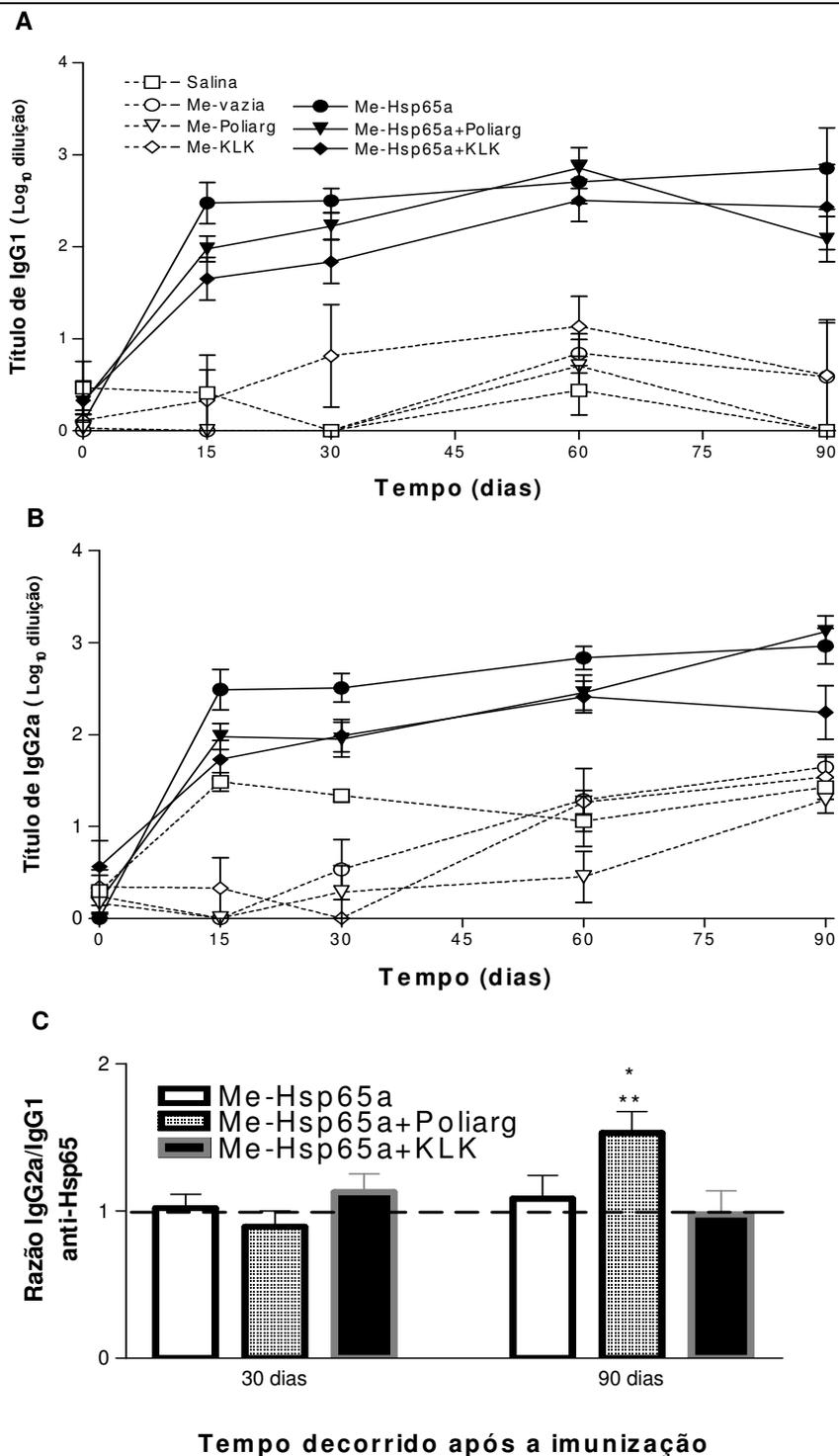
\* D<sub>4,3</sub> representa o tamanho médio da partícula (expresso como diâmetro médio em volume); D<sub>0,1</sub>, D<sub>0,5</sub> e D<sub>0,9</sub> representam, respectivamente, os diâmetros correspondentes a 10, 50 e 90 % da distribuição acumulada e Span é o índice que representa a polidispersidade, calculada por  $[(D_{0,9} - D_{0,1})/D_{0,5}]$ .

#### 4.2.2 - Resposta imune humoral induzida após a vacinação

Para avaliar a duração da resposta imune *in vivo* os estudos de vacinação foram realizados em dois períodos de tempo. Um grupo de animais vacinados foi monitorado por 30 dias, contados a partir da data da imunização e, o outro, por 90 dias. Assim, os camundongos imunizados com 5 mg de cada formulação pela via intramuscular foram utilizados para o estudo de imunogenicidade. Para isso foram determinados os níveis de anticorpos nos soros dos animais após 15, 30, 60 e 90 dias da imunização.

Os resultados apresentados nas Figuras 11 e 12 mostram que as formulações contendo somente a proteína recombinante Hsp65a ou Hsp65b, administradas por via intramuscular, induziram uma resposta imune humoral específica contra Hsp65. Os títulos de anticorpos anti-Hsp65 das subclasses IgG1 e IgG2a, presentes no soro dos animais vacinados, foram superiores àqueles observados nos grupos controle, que receberam salina ou a formulação vazia.

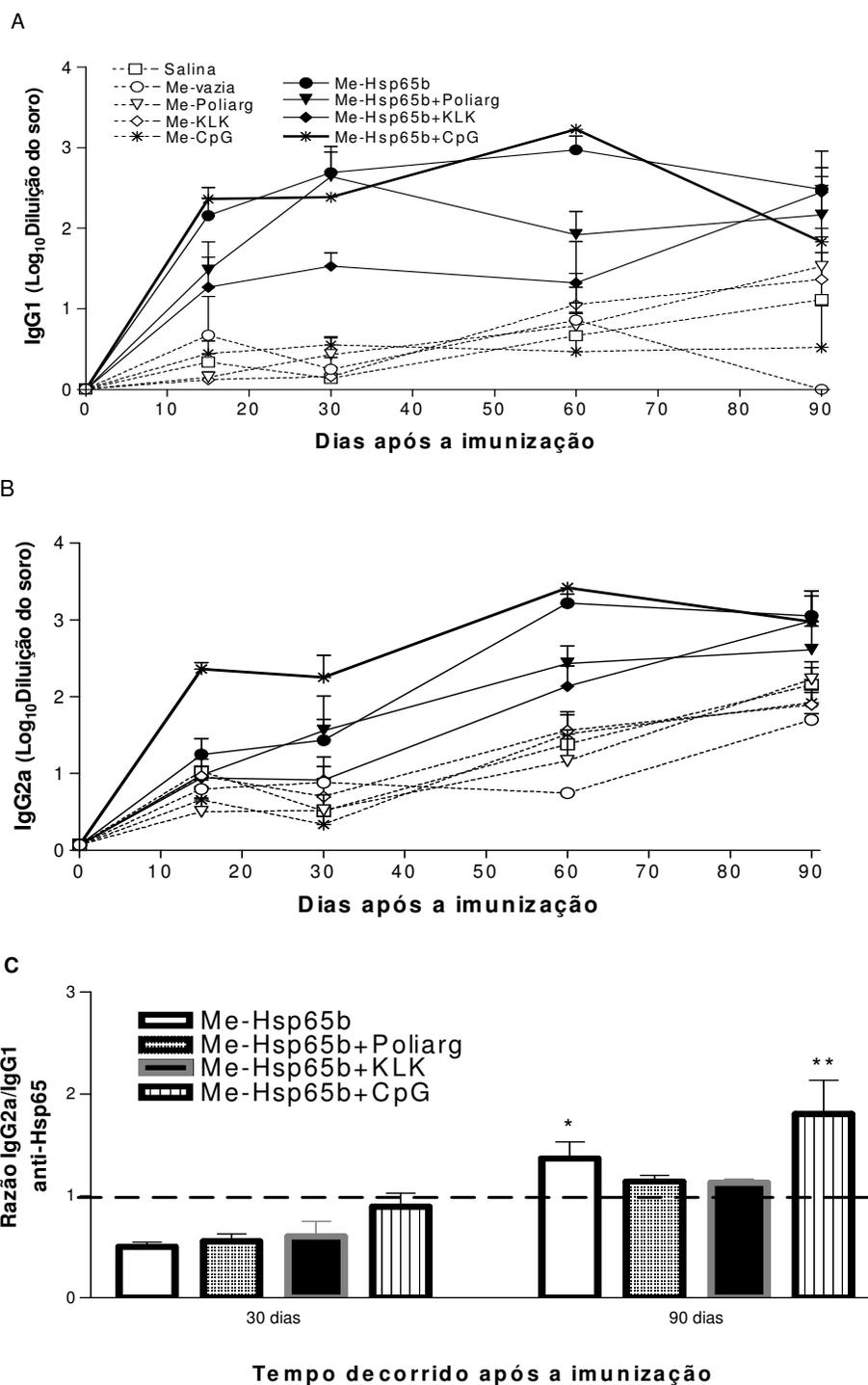
A resposta induzida pelas formulações contendo Hsp65a+Poliarginina ou Hsp65a+KLK foi equivalente àquela obtida somente com Hsp65a mas superior à resposta dos grupos controles, vacinados com formulações contendo apenas os adjuvantes. Assim, a adição dos adjuvantes às formulações contendo Hsp65a não aumentou a resposta humoral contra a proteína Hsp65. A Figura 11 também mostra que esse padrão de resposta foi sustentado até 90 dias e que a razão IgG2a/IgG1 foi 1 após 30 dias da imunização tendo se mantido próxima de 1 nos grupos Hsp65a e Hsp65a+KLK e tendo aumentado significativamente no grupo Hsp65a+Poliarginina 90 dias após a imunização (Figura 11C).



**Figura-11: Níveis de anticorpos anti-Hsp65a após a vacinação.** A) Títulos de IgG1; B) Títulos de IgG2a e C) Razão IgG2a/IgG1. Camundongos da linhagem BALB/c foram vacinados por via *i.m.* com as formulações contendo rHsp65a e/ou os adjuvantes (Poliarginina e KLK) e receberam 10  $\mu$ g de rHsp65a por via endovenosa nos dias 29 ou 89 após a vacinação. O sangue obtido 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias após a vacinação foi utilizado para separar o soro onde foi detectado o nível de anticorpos específicos por ELISA. Os títulos de anticorpos foram representados pela conversão da diluição para logaritmo decimal ( $\text{Log}_{10}$ ). [\*  $p < 0,05$ , comparação em relação ao grupo Me-Hsp65a 90 dias e Me-Hsp65a+Poliarginina 30 dias e \*\*  $p < 0,01$ , comparação em relação ao grupo Me-Hsp65a+KLK 90 dias].

Na resposta induzida pelas formulações contendo a proteína Hsp65b observou-se que o título de IgG1 induzido por Hsp65b+CpG foi similar àquele induzido pela formulação de Hsp65b e maior que Hsp65b+KLK. Os títulos de IgG2a induzido por Hsp65b+CpG foram maiores que os demais grupos. As formulações contendo a Hsp65b+Poliarginina ou Hsp65b+KLK induziram títulos menores que a formulação contendo apenas Hsp65b (Figuras 12A e 12B). Esse último resultado difere do que foi observado anteriormente quando se encapsulou a proteína Hsp65a (menos purificada) com os adjuvantes, Poliarginina ou KLK. Naqueles experimentos essas formulações também induziram respostas similares à da formulação contendo Hsp65a (Figura 11). Também pode-se observar que 90 dias após a imunização a razão IgG2a/IgG1 aumentou para todos os grupos em relação aos respectivos grupos avaliados 30 dias após a imunização. Entretanto, de forma significativa aumentaram apenas nos grupos que receberam as formulações de Hsp65b e Hsp65b+CpG (Figura 12C). Esses resultados sugerem que a presença de maiores quantidades de LPS no início da resposta parece favorecer um equilíbrio na produção de IgG2a/IgG1 (Figura 11C), enquanto que a redução desse imunomodulador parece estar relacionada, no início dessa resposta, a um favorecimento da produção de IgG1 em relação a IgG2a como mostra a Figura 12C. Esses resultados estão de acordo com aqueles apresentados na Figura 2A, onde mostramos que a remoção parcial do LPS, através do tratamento com Triton-X114, também promoveu mudanças no padrão de imunoglobulinas induzidas após imunização com formulações contendo a proteína com maior ou menor quantidade de LPS. Nessa mesma figura (2A) também mostrou-se que o padrão de resposta analisado pela razão IgG2a/IgG1 é constante durante os 30 dias em que se acompanhou a resposta imune humoral.

É interessante notar ainda que os títulos de anticorpos, se comparados ao perfil de liberação da proteína, aumentam com a disponibilização gradual do antígeno (Figura 9) e se mantém mesmo após a sua liberação completa (30 dias). Esses resultados reforçam que esse tipo de liberação controlada do antígeno é importante para a sustentação da resposta imune e muito interessante do ponto de vista prático porque a resposta é sustentada sem a necessidade de doses complementares de reforço da proteína.



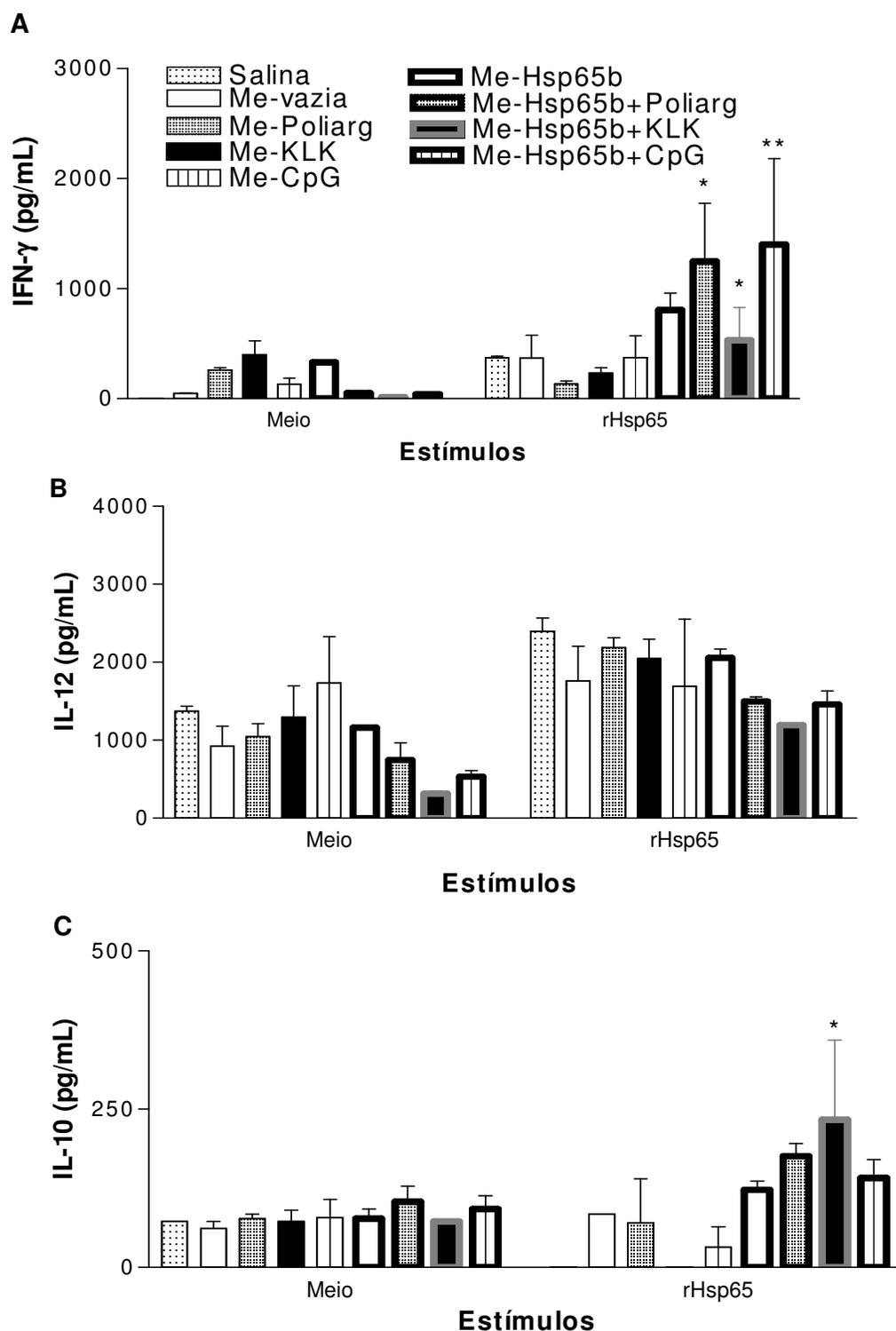
**Figura 12: Níveis de anticorpos anti-Hsp65b após a vacinação.** A) IgG1; B) IgG2a e C) Razão IgG2a/IgG1 anti-Hsp65. Camundongos da linhagem BALB/c foram vacinados por via *i.m.* com as formulações contendo rHsp65b e/ou adjuvantes (Poliarginina, KLK e CpG) e receberam 10 µg de rHsp65b por via endovenosa nos dias 29 ou 89 após a vacinação. O sangue obtido 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias após a vacinação foi utilizado para separar o soro onde foi detectado o nível de anticorpos específicos por ELISA. Os títulos de anticorpos foram representados pela conversão da diluição para logaritmo decimal ( $\text{Log}_{10}$ ). [\*  $p < 0,05$  diferença em relação a Hsp65b 30 dias e \*\*  $p < 0,01$  diferença em relação a Hsp65b+CpG].

#### 4.2.3 – Resposta imune celular induzida após a vacinação

##### ➤ 30 dias após a vacinação

Para determinar o padrão de resposta celular induzido pelas diferentes formulações, camundongos BALB/c receberam uma injeção intramuscular de 5 mg de microesferas contendo a proteína (Hsp65b) e/ou os adjuvantes (KLK, Poliarginina ou CpG). Após 30 dias dessa imunização esses animais foram mortos e as células do baço foram re-estimuladas *in vitro* com Concanavalina A (Con-A) ou com Hsp65b e após 48 horas de incubação os sobrenadantes foram recolhidos e congelados, para a posterior quantificação de citocinas por ELISA.

Conforme mostrado na Figura 13, após 30 dias da imunização os animais que receberam microesferas contendo Hsp65b foram capazes de responder de forma específica ao antígeno Hsp65b. Em relação à produção de IFN- $\gamma$  observou-se que tanto a formulação contendo apenas a proteína quanto aquelas contendo proteína mais os adjuvantes induziram níveis similares dessa citocina frente ao estímulo específico da Hsp65b recombinante (Figura 13A). Essa resposta foi maior que a induzida por formulações controle, microesfera vazia ou contendo apenas o adjuvante. Os grupos Hsp65b+Poliarginina e Hsp65b+CpG induziram aumento significativo nos níveis dessa citocina quando comparados com os respectivos controles, não estimulados. Outras citocinas avaliadas foram a IL-12 e IL-10, nesse caso também se observaram similaridades na resposta dos grupos que receberam as formulações contendo a proteína (Figuras 13B e 13C). A produção de IL-12 pelos grupos-controle tanto não estimulados (meio de cultura) ou estimulados com Hsp65b foi maior que a dos grupos que foram vacinados com Hsp65b e/ou adjuvantes (Figura 13B). A produção de IL-10 específica foi significativamente maior no grupo vacinado com Hsp65b+KLK (Figura 13C). Esses resultados mostram que após 30 dias da imunização os animais que receberam as formulações contendo Hsp65b+Poliarginina, Hsp65b+KLK e Hsp65b+CpG desenvolveram respostas imunes específicas tendendo para o padrão Th1, uma vez que induziram níveis significativos de IFN- $\gamma$ . Animais vacinados com Hsp65b+KLK induziram níveis significativos de IFN- $\gamma$  e também IL-10, tendendo portanto a um padrão de resposta misto Th1/Th2.



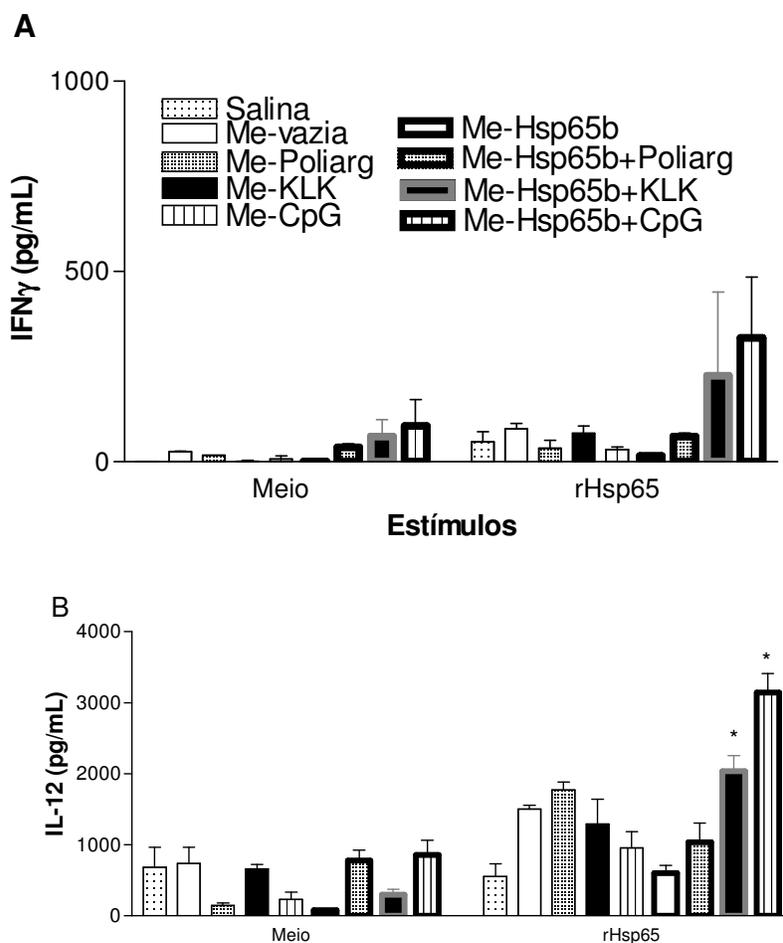
**Figura 13: Resposta celular induzida após 30 dias da vacinação com formulações contendo rHsp65b.** A) IFN- $\gamma$ ; B) IL-12 e C) IL-10. Camundongos BALB/c foram vacinados por via *i.m.* com as diferentes formulações contendo rHsp65b e/ou adjuvantes (Poliarginina, KLK ou CpG), receberam 10  $\mu$ g de rHsp65b por via endovenosa no dia 29 e foram mortos no dia 30 após a vacinação. Células totais do baço desses animais foram re-estimuladas *in vitro* com rHsp65b ou Con A e após 48 horas de cultura os sobrenadantes foram recolhidos para a detecção de citocinas por ELISA. [\* $p$ <0,05 e \*\* $p$ <0,01, comparação realizada com os respectivos controles não estimulados (meio) ou só adjuvante]

➤ *90 dias após a vacinação*

Um outro objetivo desse trabalho seria formular uma vacina que induzisse uma proteção de longa duração após única administração. Por isso, também foram realizados os ensaios de imunogenicidade após 90 dias da vacinação com as formulações desenvolvidas. Em relação à produção de citocinas observou-se que a resposta imune específica avaliada pela re-estimulação de células com a proteína Hsp65b recombinante foi pequena se comparada à resposta observada após 30 dias da imunização (Figura 14). Vale salientar que, em ambos os períodos avaliados a resposta frente ao estímulo inespecífico foi menor nos grupos que receberam formulações contendo Hsp65b co-encapsulada ou não com os adjuvantes. Sugerindo, portanto, que aos 90 dias a resposta imune contra Hsp65 diminuiu e indicando a necessidade de se pensar em uma estratégia para reforçar a resposta imune específica.

A produção de IFN- $\gamma$  frente ao estímulo da proteína Hsp65 recombinante tendeu a ser maior nos animais que receberam as formulações contendo Hsp65b+CpG ou Hsp65b+KLK, embora não tenha sido uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo imunizado com formulação contendo apenas a proteína (Figura 14A).

A produção específica de IL-12 foi maior nos grupos que receberam as formulações contendo Hsp65b+CpG, Hsp65b+KLK ou formulação vazia em relação ao grupo que recebeu salina (Figura 14B) e a produção de IL-10 foi inferior ao menor ponto da curva padrão para a quantificação dessa citocina e, por esse motivo, não foi mostrada.

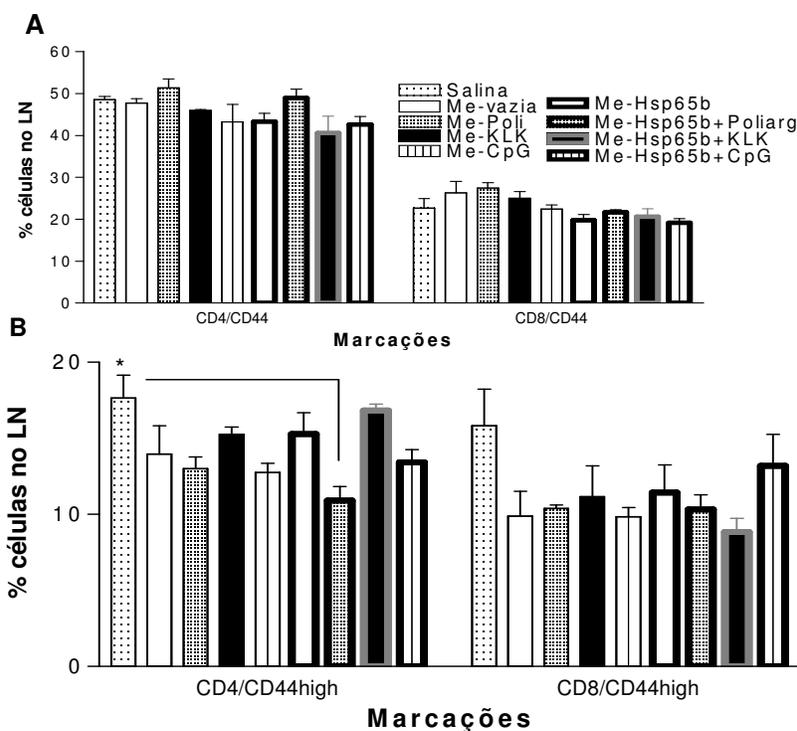


**Figura 14: Resposta celular induzida após 90 dias da vacinação com formulações contendo rHsp65b.** A) IFN- $\gamma$  e B) IL-12. Camundongos BALB/c foram vacinados por via *i.m.* com as diferentes formulações contendo rHsp65b e/ou adjuvantes (Poliarginina, KLK ou CpG), receberam 10  $\mu$ g de rHsp65b por via endovenosa no dia 89 e foram mortos no dia 90 após a vacinação. Células totais do baço desses animais foram re-estimuladas *in vitro* com rHsp65b ou Con A e após 48 horas de cultura os sobrenadantes foram recolhidos para a detecção de citocinas por ELISA. [\*  $p < 0,05$  diferença em relação Me-Hsp65b e Hsp65b+KLK e Me-Hsp65b+CpG diferente ainda de Me-CpG].

#### 4.2.4 – Expressão de moléculas de superfície celular

##### ➤ 30 dias após a vacinação

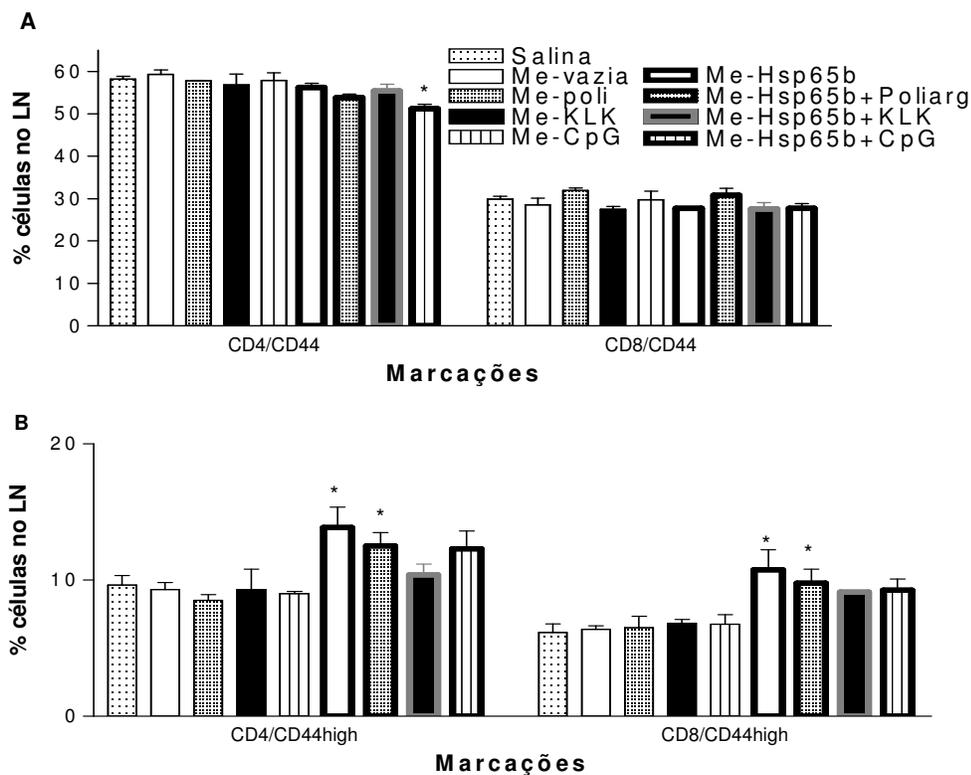
Outro parâmetro utilizado para avaliar a resposta imune foi a expressão de marcadores imunológicos na superfície de células obtidas do linfonodo poplíteo de animais imunizados com as diferentes formulações. O CD44 é uma molécula de adesão importante para o direcionamento de linfócitos ao tecido e a sua expressão em alta quantidade (CD44<sup>high</sup>) na superfície celular serve como um marcador de ativação. Por isso, foi estudada a expressão de CD44 nas populações de células CD4 ou CD8. Vale salientar que essas células foram amplamente estudadas e caracterizadas por nosso grupo, de modo que os fenótipos que desempenham um papel essencial na proteção contra tuberculose experimental foram descritos em trabalhos anteriores (BONATO *et al*, 1998; SILVA & LOWRIE, 2000). Nossos resultados mostraram que a administração das formulações contendo Hsp65b ou Hsp65b+adjuvantes, ou ainda, somente os adjuvantes não promoveram mudanças significativas na população de células CD4 e CD8, que co-expressam CD44 nos linfonodos drenantes da região onde foi administrada a vacina (Figura 15A). Entretanto, observou-se uma diminuição da expressão de CD44<sup>high</sup> em CD4 no grupo que recebeu formulação contendo Hsp65b+Poliarginina (Figura 15B). Esses resultados mostram que houve uma manutenção da população de células presentes nos linfonodos drenantes (poplíteos).



**Figura 15:** Expressão de CD44 em células CD4 ou CD8 de LN após 30 dias da vacinação. Camundongos BALB/c foram vacinados por via *i.m.* com as diferentes formulações contendo rHsp65b e/ou adjuvantes (Poliarginina, KLK ou CpG) e foram mortos 30 dias após a vacinação. Células dos linfonodos poplíteos (LN) foram marcadas com anticorpos fluoresceinados anti-CD4 ou CD8 e anti-CD44 e analisadas em citômetro de fluxo. \*  $p < 0,05$ .

### ➤ 90 dias após a vacinação

Quanto à presença de CD4 e CD8 expressando CD44 após 90 dias da imunização, tal como aos 30 dias não houve mudanças significativas na população dessas células no linfonodo (Figura 16A). A quantidade de células expressando CD4/CD44<sup>high</sup> e CD8/CD44<sup>high</sup> aumentou nos grupos que receberam as formulações contendo Hsp65b e adjuvantes, entretanto, o aumento só foi significativo para a formulação Hsp65b (Figura 16B). Isso mostra que houve uma mudança na população de células presentes nos linfonodos poplíteos de animais que receberam alguma formulação contendo a proteína Hsp65. Cabe aqui descrever que a porcentagem de células que apresentaram o fenótipo CD44<sup>high</sup> foi menor aos 90 dias quando comparado com 30 dias de imunização. Desta forma, mostrou-se mais uma vez que a resposta imune foi diminuindo ao longo do tempo após a imunização.



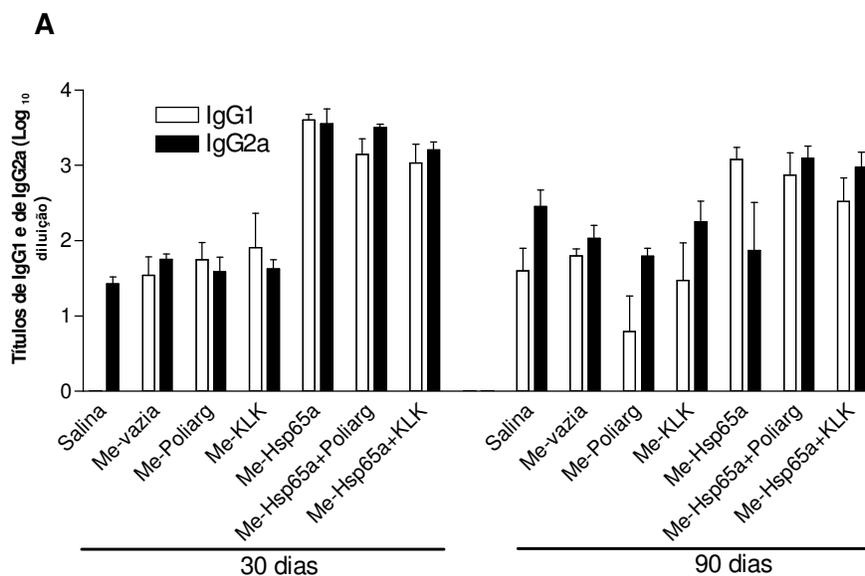
**Figura 16: Expressão de CD44 em células CD4 ou CD8 de LN após 90 dias da vacinação.** Camundongos BALB/c foram vacinados por via *i.m.* com as diferentes formulações contendo rHsp65b e/ou adjuvantes (Poliarginina, KLK ou CpG) e foram mortos 90 dias após a vacinação. Células dos linfonodos poplíteos (LN) foram marcadas com anticorpos fluoresceinados anti-CD4 ou CD8 e anti-CD44 e analisadas em citômetro de fluxo. \* $p < 0,05$ , diferente em relação aos controles (adjuvantes).

#### 4.2.5 – Resposta imune humoral nos animais imunizados e infectados

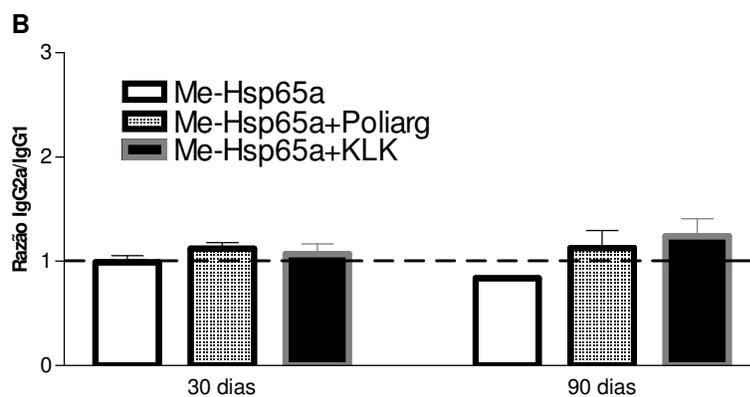
Após verificar que as diferentes formulações contendo Hsp65 e/ou adjuvantes foram capazes de induzir uma resposta imune específica, foram realizados os ensaios para avaliar a capacidade dessas formulações vacinais em induzir proteção contra a infecção. Para isso, 30 ou 90 dias após a vacinação os animais foram infectados com a cepa de *M. tuberculosis* H37Rv e 30 dias após esse desafio foram mortos. O sangue desses animais foi obtido por punção cardíaca, o soro separado e, em seguida, utilizado para avaliar os níveis de anticorpos anti-Hsp65.

Aqui apresentamos novamente os resultados obtidos tanto com formulações preparadas com a proteína Hsp65a quanto Hsp65b. Em relação a proteína menos purificada (Hsp65a) os resultados mostraram que, nos grupos infectados após 30 dias da imunização, qualquer uma das formulações contendo Hsp65a induziu aumento significativo da resposta de anticorpos em relação aos controles. Os títulos de anticorpos das subclasses IgG1 ou IgG2a produzidos foram equivalentes entre os grupos que receberam as formulações contendo Hsp65a e/ou os adjuvantes (Figura 17A). A razão IgG2a/IgG1 nos animais infectados após 30 ou 90 dias da imunização foi próxima de 1 e similar entre os grupos experimentais. Entretanto, os animais que foram imunizados com a formulação contendo somente a proteína produziram mais IgG1 que IgG2a (Figura 17A e 17B), isso pode indicar uma maior tendência dessa formulação em induzir uma resposta do tipo Th2, comparada com as respostas para as formulações de proteína e adjuvantes. Além disso, os altos títulos de anticorpos nos animais vacinados com as formulações controles, sem a proteína, podem ser justificados pela própria infecção que deve estar induzindo a resposta contra Hsp65.

Em relação a proteína mais purificada (Hsp65b) observa-se que qualquer uma das formulações contendo Hsp65 induziu aumento significativo da resposta de anticorpos específicos IgG1 em relação aos controles, tendo sido o aumento de IgG2a mais discreto tanto para animais infectados 30 quanto 90 dias após a imunização (Figura 18). Os títulos de IgG2a sérica do experimento com desafio aos 30 dias da imunização, só foram maiores que os controles nos grupos que receberam a formulação contendo Hsp65b ou contendo Hsp65b+Poliarginina. Aos 90 dias somente o grupo que recebeu Hsp65b+CpG na formulação vacinal apresentou um maior título de IgG2a sérica em relação ao seu respectivo controle (Figura 18A). Além desse resultado, também se observou que todos os grupos que receberam as formulações contendo Hsp65 apresentaram valores semelhantes para a razão IgG2a/IgG1 aos 30 e aos 90 dias da imunização, entretanto, comparando-se a razão em 30 e 90 dias observou-se que houve um aumento, não significativo, com o passar do tempo (Figura 18B) conforme também observado no ensaio de imunogenicidade (Figura 12C).

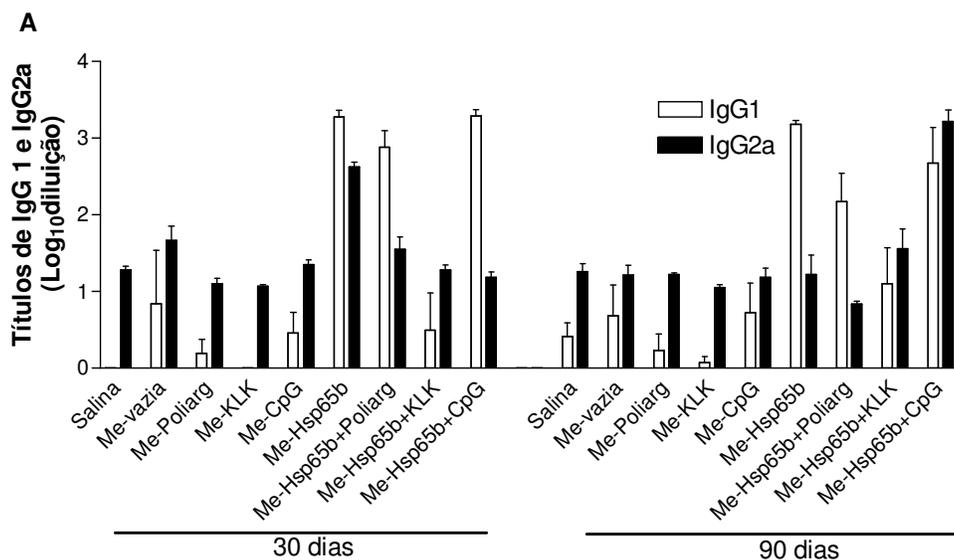


**Animais infectados por *M. tuberculosis* H37Rv após 30 ou 90 dias da imunização com as diferentes formulações**

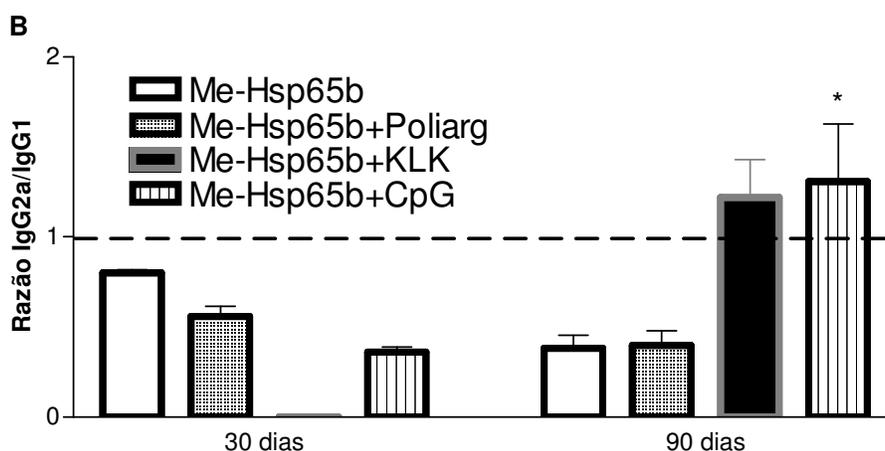


**Animais infectados por *M. tuberculosis* H37Rv após 30 ou 90 dias da imunização com as diferentes formulações**

**Figura-17: Níveis de anticorpos anti-Hsp65a em animais vacinados e infectados.** A) Resposta humoral e B) Razão IgG2a/IgG1. Camundongos da linhagem BALB/c foram vacinados por via *i.m.* com as formulações contendo rHsp65a e/ou adjuvantes (Poliarginina, KLK e CpG). Após 30 ou 90 dias da vacinação foram infectados com *M. tuberculosis* H37Rv e 30 dias após a infecção foram mortos. O sangue obtido foi utilizado para separar o soro onde foi detectado o nível de anticorpos específicos por ELISA. Os títulos de anticorpos foram representados pela conversão da diluição para logaritmo decimal (Log<sub>10</sub>).



Animais infectados por *M. tuberculosis* H37Rv após 30 ou 90 dias da imunização com as diferentes formulações



Animais infectados por *M. tuberculosis* H37Rv após 30 ou 90 dias da imunização com as diferentes formulações

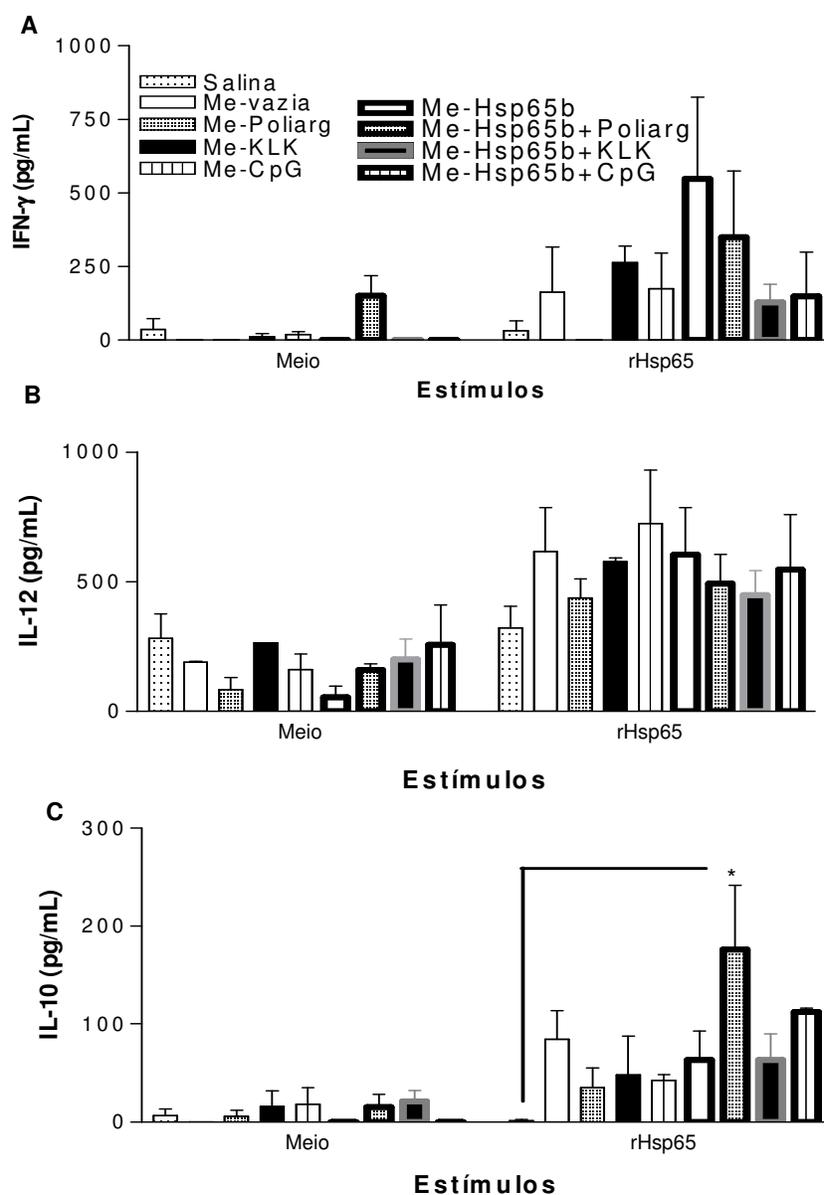
**Figura 18: Níveis de anticorpos anti-Hsp65b em animais vacinados e infectados.** A) Resposta humoral e B) Razão IgG2a/IgG1. Camundongos da linhagem BALB/c foram vacinados por via *i.m.* com as formulações contendo rHsp65b e/ou adjuvantes (Poliarginina, KLK e CpG). Após 30 ou 90 dias da vacinação foram infectados com *M. tuberculosis* H37Rv e 30 dias após a infecção foram mortos. O sangue obtido foi utilizado para separar o soro onde foi detectado o nível de anticorpos específicos por ELISA. Os títulos de anticorpos foram representados pela conversão da diluição para logaritmo decimal (Log<sub>10</sub>). O grupo Me-Hsp65b+KLK não aparece no ítem B aos 30 dias porque o título de IgG1 foi igual a 0 para 2 animais. Apenas um dos animais produziu níveis detectáveis de IgG1 assim a relação IgG2a/IgG1 foi de 1,96, porém não foi mostrada no gráfico que expressa a média obtida nos demais grupos. \*p<0,05 diferente em relação ao respectivo grupo 30 dias.

#### ***4.2.6 – Resposta imune celular***

##### ***➤ Animais infectados após 30 dias da vacinação e mortos 30 dias após o desafio***

Conforme mostra a Figura 19, os animais que receberam microesferas contendo Hsp65b foram capazes de responder de forma específica ao antígeno Hsp65 embora não se observem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos imunizados com as diferentes formulações que contém Hsp65 e os seus controles.

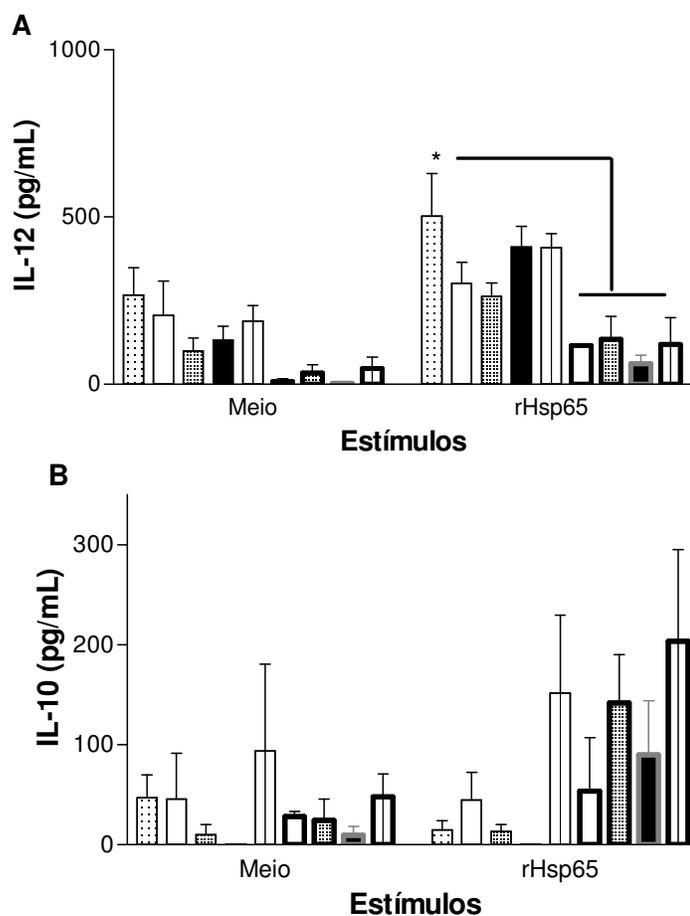
Em relação à produção de IFN- $\gamma$  observamos que a formulação contendo apenas a proteína foi a que potencialmente mais induziu a produção dessa citocina frente ao estímulo específico da Hsp65b recombinante (Figura 19A). A produção de IL-12 frente ao estímulo da Hsp65 foi similar entre todos os grupos (Figura 19B). A citocina IL-10 foi detectada em baixos níveis e se observou uma diferença significativa entre o grupo que recebeu salina e o grupo que recebeu a formulação contendo Hsp65b+Poliarginina (Figura 19C).



**Figura 19: Resposta celular induzida após a infecção de animais vacinados por 30 dias com as formulações contendo rHsp65b.** A) IFN- $\gamma$ ; B) IL-12 e C) IL-10. Camundongos BALB/c foram vacinados por via *i.m.* com as diferentes formulações contendo rHsp65b e/ou adjuvantes (Poliarginina, KLK ou CpG) e 30 dias após a vacinação foram infectados com *M. tuberculosis* H37Rv. 30 dias após a infecção foram mortos. Células totais do baço desses animais foram re-estimuladas *in vitro* com rHsp65b ou Con A e após 48 horas de cultura os sobrenadantes foram recolhidos para a detecção de citocinas por ELISA. (\*p < 0,05)

➤ *Animais infectados após 90 dias da vacinação e mortos 30 dias após o desafio*

Conforme mostra a Figura 20, a resposta medida pela produção de citocinas foi menor comparada a resposta obtida com os animais infectados após 30 dias da imunização (Figura 19). Em relação à produção de IFN- $\gamma$  a resposta frente ao estímulo específico foi muito baixa (dado não mostrado) e, frente ao estímulo inespecífico, as formulações contendo a proteína também induziram a produção de baixos níveis dessa citocina (dado não mostrado). A produção de IL-12 frente ao estímulo da Hsp65 foi significativamente menor nos grupos que receberam as formulações contendo Hsp65 (Figura 20A) e a citocina IL-10, também foi detectada em baixos níveis em todos os grupos e tendeu a ser produzida em maior quantidade por animais que receberam Hsp65 na formulação (Figura 20B).



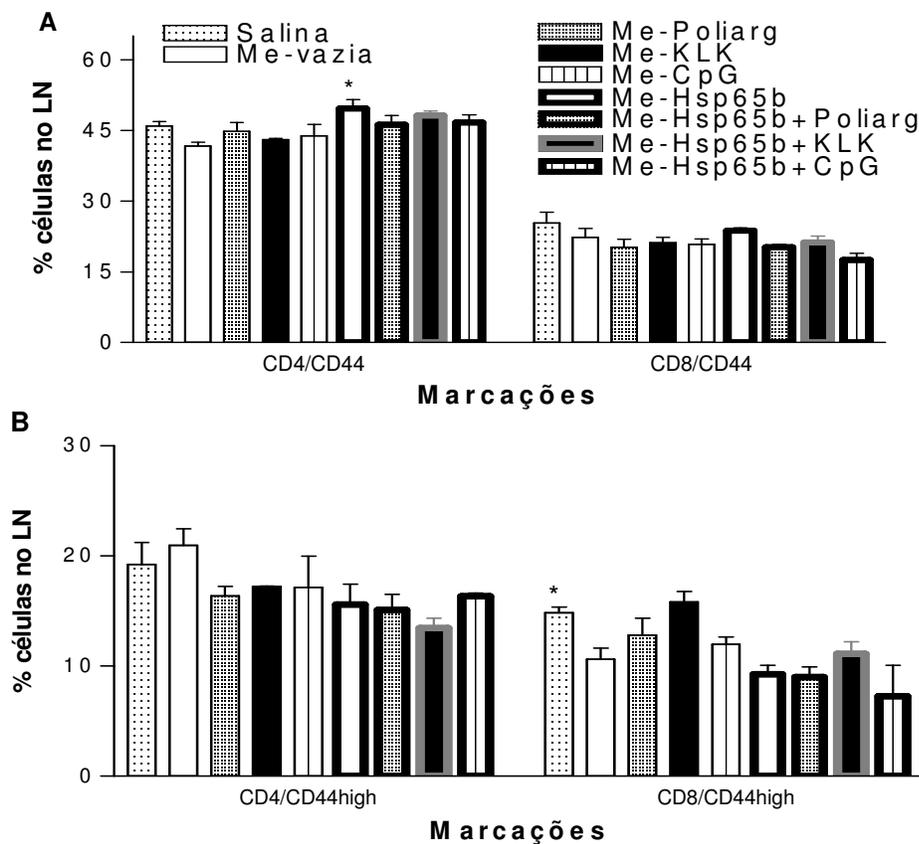
**Figura 20: Resposta celular induzida após a infecção de animais vacinados por 90 dias com as formulações contendo rHsp65b.** A) IL-12 e B) IL-10. Camundongos BALB/c foram vacinados por via *i.m.* com as diferentes formulações contendo rHsp65b e/ou adjuvantes (Poliarginina, KLK ou CpG) e 90 dias após a vacinação foram infectados com *M. tuberculosis* H37Rv. 30 dias após a infecção foram mortos. Células totais do baço desses animais foram re-estimuladas *in vitro* com rHsp65b ou Con A e após 48 horas de cultura os sobrenadantes foram recolhidos para a detecção de citocinas por ELISA.

#### 4.2.7 – Expressão de marcadores de superfície celular: animais imunizados e infectados

##### ➤ Animais infectados 30 ou 90 dias após a vacinação e mortos 30 dias após o desafio

Nossos resultados mostraram que os animais infectados 30 dias após a vacinação apresentaram uma redução na porcentagem de CD8/CD44 comparando-se o grupo controle ou a formulação de Hsp65b com o grupo que recebeu a formulação de Hsp65b+CpG no linfonodo (Figura 21A). Além disso, observou-se também que alguns dos grupos que receberam as formulações contendo a proteína tiveram uma diminuição da porcentagem de células CD8 que expressam altos níveis de CD44 na sua superfície (Figura 21B). A mudança na população celular nos linfonodos poplíteos sugere que células específicas para Hsp65 possam estar migrando para o pulmão onde estão presentes os bacilos. E ainda sugerem que as células que migraram apresentem um fenótipo de célula ativada (expressam CD44<sup>high</sup>) já que alguns grupos que receberam as formulações de Hsp65b ou Hsp65b+adjuvante tiveram uma diminuição na população de células CD4 ou CD8 expressando CD44<sup>high</sup>. Isso porque nos ensaios com animais somente vacinados parece haver uma manutenção da população de células com fenótipo ativado (Figura 15).

Para os animais infectados 90 dias após a vacinação com Hsp65b observou-se que não houve mudanças significativas na população de células CD4 ou CD8 ativadas (CD44<sup>high</sup>), Figuras 22A e 22B. Entretanto, esse resultado ainda sugere que as células com fenótipo ativado possam estar migrando para o sítio de infecção uma vez que aos 90 dias da imunização observou-se aumento desse fenótipo ativado em células CD4 ou CD8 (Figura 16). Para determinar se essas células estariam migrando para o pulmão seria necessário avaliar o fenótipo celular no tecido pulmonar. Além disso, é importante determinar a especificidade dessas células já que após a infecção células com especificidades para diferentes antígenos micobacterianos devem migrar para o microambiente pulmonar.



**Figura 21:** Expressão de CD44 em células CD4 ou CD8 de LN após a infecção de animais vacinados por 30 dias. Camundongos BALB/c foram vacinados por via *i.m.* com as diferentes formulações contendo rHsp65b e/ou adjuvantes (Poliarginina, KLK ou CpG) foram infectados com *M. tuberculosis* H37Rv após 30 dias da vacinação e mortos 30 dias após a infecção. Células dos linfonodos poplíteos (LN) foram marcadas com anticorpos fluoresceinados anti-CD4 ou CD8 e anti-CD44 e analisadas em citometro de fluxo. \*  $p < 0,05$ .

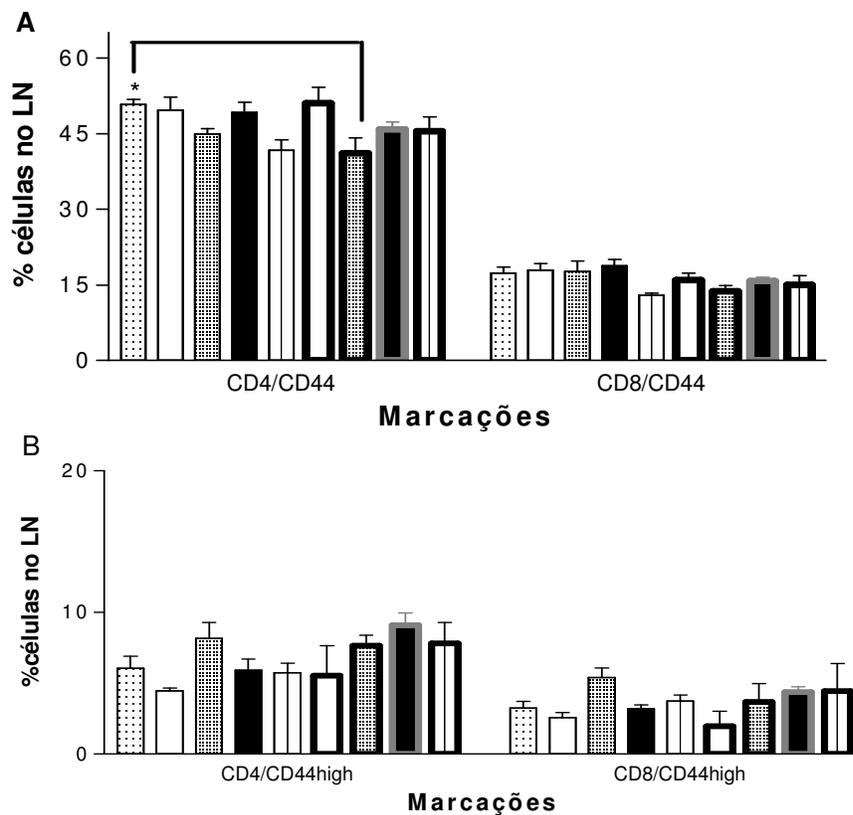
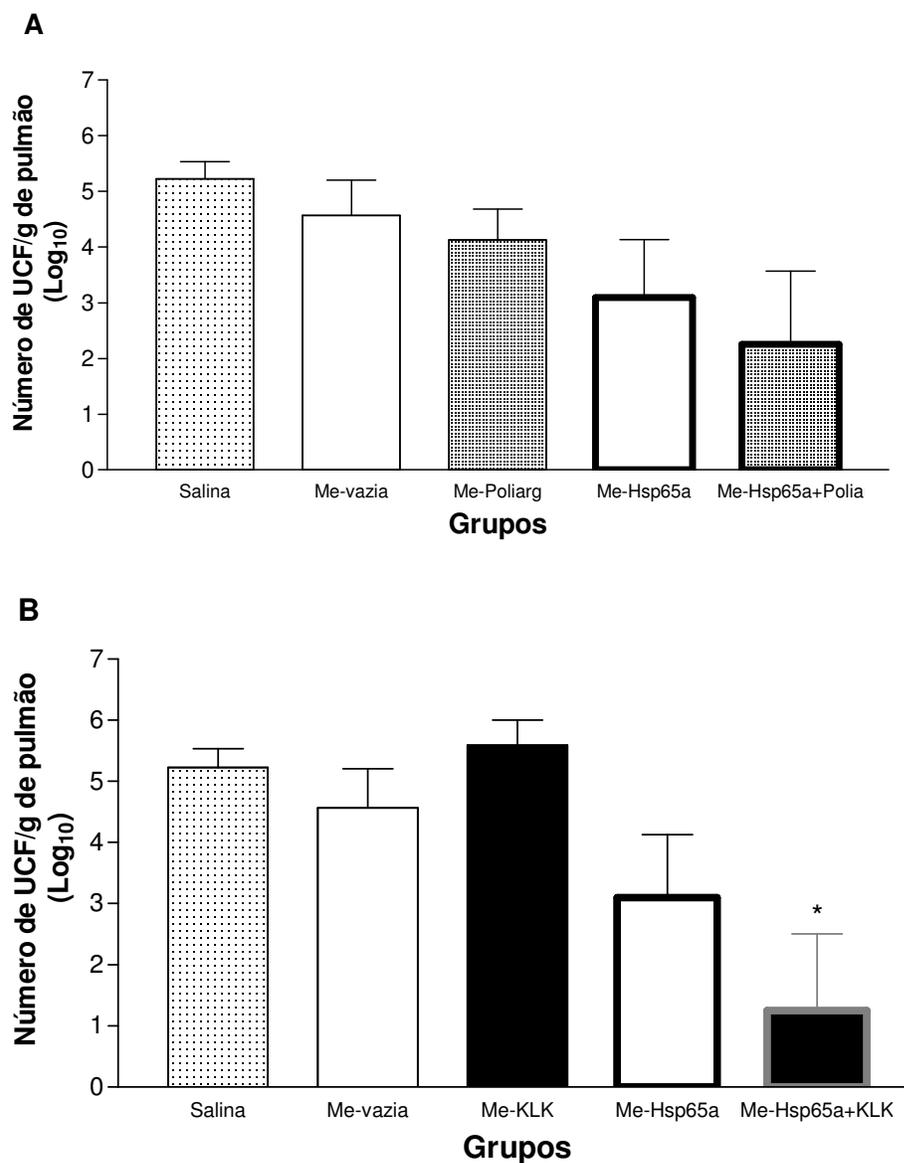


Figura 22: *Expressão de CD44 em células CD4 ou CD8 de LN após a infecção de animais vacinados por 90 dias.* Camundongos BALB/c foram vacinados por via *i.m.* com as diferentes formulações contendo rHsp65b e/ou adjuvantes (Poliarginina, KLK ou CpG) foram infectados com *M. tuberculosis* H37Rv após 90 dias da vacinação e mortos 30 dias após a infecção. Células dos linfonodos poplíteos (LN) foram marcadas com anticorpos fluoresceinados anti-CD4 ou CD8 e anti-CD44 e analisadas em citômetro de fluxo. \*  $p < 0,05$ .

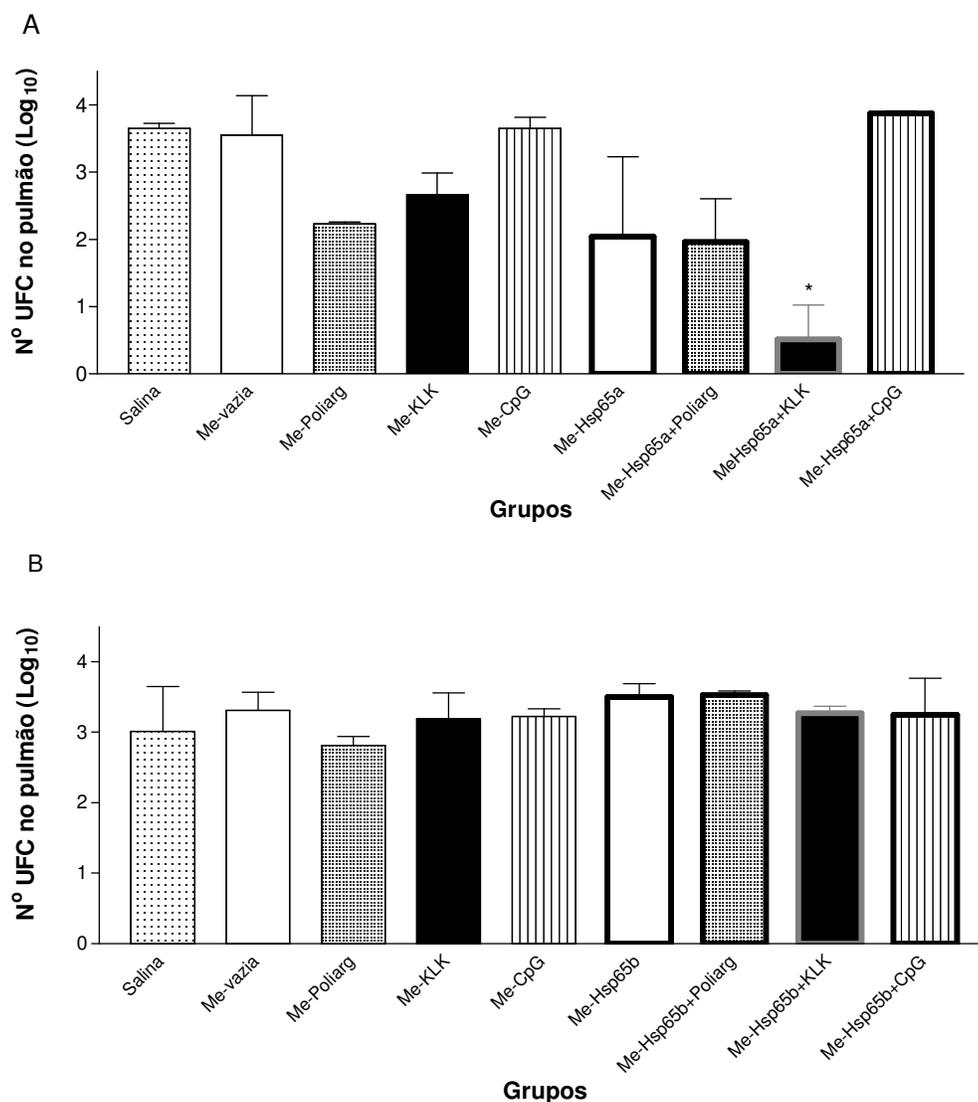
#### **4.2.8 – Ensaio de proteção**

No ensaio de proteção foi avaliado o número de unidades formadoras de colônia de micobactéria por unidade de peso de pulmão (UFC/g). Para isso, animais previamente vacinados com as formulações contendo a proteína menos (Hsp65a) ou mais (Hsp65b) purificada foram infectados e mortos 30 dias após a infecção. Os pulmões foram processados como descrito no item 3.14 e o número de unidades formadoras de colônia foi determinado entre 3 a 4 semanas após o plaqueamento do material obtido desse órgão. Os resultados do ensaio de proteção de animais desafiados 30 dias após a imunização com as formulações preparadas com a Hsp65a (menos purificada) foram descartados devido ao ressecamento das placas onde cresciam as bactérias recuperadas do pulmão. Entretanto, os resultados obtidos 90 dias após a imunização mostraram que a proteína sozinha encapsulada em microesfera não foi capaz de induzir proteção significativa nos animais desafiados embora tenha favorecido a redução da carga bacilar no pulmão (Figura 23A). A vacina contendo Hsp65a+Poliarginina (poliaminoácido catiônico) reduziu o número de bacilos e foi capaz de proteger os animais contra a infecção por *M. tuberculosis*. A formulação vacinal contendo Hsp65a+KLK foi capaz de conferir proteção significativa a animais infectados. Ou seja, os animais vacinados com essa formulação apresentaram uma redução significativa no número de UFC de cerca de 100 vezes em relação ao grupo controle (Figura 23B).



**Figura 23: Número de unidades formadoras de colônia (UFC) no pulmão de animais vacinados (90 dias) e infectados.** Camundongos BALB/c foram vacinados por via *i.m.* e infectados após 90 dias com *M. tuberculosis* H37Rv e mortos 30 dias da infecção. Fragmentos dos pulmões desses animais foram processados, diluídos seriadamente e plaqueados em meio sólido 7H11 para a determinação do número de UFC. A) Animais vacinados com a formulação contendo Hsp65a+Poliarginina e B) Animais vacinados com a formulação contendo Hsp65a+KLK. Os resultados foram expressos em logaritmo decimal (Log<sub>10</sub>) do número de UFC por grama de pulmão ± SEM. \**p*<0,05 diferente em relação a salina, Me-vazia e Me-KLK.

Utilizando-se as formulações contendo a Hsp65b observou-se que, nos animais infectados após 30 dias da imunização, a formulação contendo Hsp65b+KLK foi a mais eficiente em proteger contra a infecção por *M. tuberculosis*, conforme mostrado na Figura 24A. Entretanto, a resposta protetora induzida pela formulação de Hsp65b+KLK não foi mantida quando a infecção foi feita após 90 dias de imunização (Figura 24B). Isso mostra que a resposta foi de duração mais curta se comparada a proteção observada quando a proteína menos purificada foi encapsulada juntamente com o KLK (Hsp65a+KLK), Figura 23B.



**Figura 24: Número de unidades formadoras de colônia (UFC) no pulmão de animais vacinados e infectados.** Camundongos BALB/c foram vacinados por via *i.m.* e infectados após (A) 30 ou (B) 90 dias com *M. tuberculosis* H37Rv e mortos 30 dias após a infecção. Fragmentos dos pulmões desses animais foram processados, diluídos seriadamente e plaqueados em meio sólido 7H11 para a determinação do número de UFC. Os resultados foram expressos em logaritmo decimal (Log<sub>10</sub>) do número de UFC por grama de pulmão  $\pm$  SEM. \* $p < 0,001$  diferente em relação a salina, Me-vazia, Me-CpG e Me-Hsp65b+CpG e  $p < 0,05$  em relação a Me-KLK.

#### **4.2.9 – Análise histopatológica de cortes do pulmão dos animais infectados por *M. tuberculosis***

Além da proteção, em termos de redução na carga bacilar nos pulmões, outro parâmetro importante é a análise histopatológica dos pulmões de animais infectados. Tem se mostrado cada vez mais que essa avaliação é essencial para a determinação e escolha das melhores vacinas, uma vez que as respostas exacerbadas que levam a redução da carga bacilar também podem levar a danos maiores ao parênquima pulmonar. De forma semelhante ao exposto no item anterior, analisamos os pulmões de animais que receberam formulações contendo a proteína Hsp65a e a Hsp65b.

Nas Figuras 25 e 27 foram apresentados cortes de um pulmão não infectado para mostrar um parênquima pulmonar normal. Nesses cortes observamos que os alvéolos estão preservados, garantindo a função respiratória desse tecido, e que áreas ao redor dos brônquios (peribronquial) ou vasos (perivascular) não apresentam infiltrado inflamatório (presença de linfócitos e/ou macrófagos). Na análise apresentada a seguir nos referimos ao comprometimento do parênquima pulmonar como sendo uma medida aproximada de quanto da área normal de tecido respiratório foi tomada pelo infiltrado inflamatório. Os granulomas são estruturas formadas a partir da organização dessas células inflamatórias e sua principal função é conter a infecção, delimitando e isolando as células infectadas. Nos granulomas de padrão misto estão presentes tanto linfócitos quanto macrófagos e apesar desses dois tipos celulares coexistirem no tecido infectado, o infiltrado celular pode ser predominantemente de linfócitos ou de macrófagos. Além disso, também analisamos cortes de pulmão corados por Ziehl Neelsen, onde os bacilos são identificados pela cor rosa e as células em azul.

Iniciamos a nossa análise pelo grupo que recebeu a proteína menos purificada (Hsp65a). As lâminas contendo cortes dos pulmões de animais desafiados 90 dias após a imunização foram analisadas, entretanto, o comprometimento do parênquima pulmonar foi mínimo. Esse resultado sugeriu que os lóbulos do pulmão destinados para a histologia não tenham sido a parte mais afetada pela infecção, uma vez que os outros lóbulos destinados ao protocolo de recuperação dos bacilos para a contagem de UFC apresentaram-se bastante comprometidos pela infecção. Conforme pode ser observado na Figura 23 havia uma grande quantidade de bacilos nos pulmões daqueles animais. No Apêndice 1 foram descritos detalhadamente os resultados da análise dos cortes de pulmões dos grupos infectados 30 ou 90 dias após a vacinação, entretanto, a seguir vamos descrever os principais resultados obtidos para o grupo infectado 30 dias após a vacinação.

Assim, o pulmão dos animais que receberam salina (controle) apresentou um comprometimento de 60 a 70% do parênquima pulmonar, um padrão misto de granulomas, com infiltrado linfocitário perivascular e peribronquial e reação macrofágica fora dessas áreas (Figura 25 e Tabela 3). Os granulomas observados foram confluentes e a análise das lâminas coradas por Ziehl Neelsen mostrou a presença de grande quantidade de bacilos nas áreas onde se concentram macrofágos nos granulomas (Figura 26 e Tabela 3). Os pulmões dos animais que receberam microesferas vazias apresentaram um comprometimento pulmonar entre 10 e 40%, Poliarginina entre 20 e 50% e KLK entre 20 e 30% (Figura 25 e Tabela 3). Em todos esses grupos observou-se a presença de granulomas confluentes de padrão misto (linfocitário e macrofágico). O grupo que recebeu Poliarginina apresentou poucos bacilos, o KLK apresentou quantidade moderada e a microesfera vazia uma grande quantidade de bacilos nas áreas de granulomas (Figura 26). O comprometimento do parênquima pulmonar em animais vacinadas com a formulação Hsp65a variou entre 20 e 40% e caracterizou-se pela presença de granulomas confluentes de padrão misto e com predomínio de infiltrado macrofágico (Figura 25 e Tabela 3). Também foi observada moderada presença de bacilos nas áreas de granulomas (Figura 26 e Tabela 1). No grupo que recebeu Hsp65a+Poliarginina o comprometimento do parênquima pulmonar variou entre 30 e 50% e foram observados granulomas confluentes e isolados com padrão misto de infiltrado celular (Figura 25). O melhor resultado foi obtido com a formulação que contém Hsp65a+KLK. Nesse grupo observou-se um comprometimento entre 5 e 20% do parênquima pulmonar, a presença de granulomas isolados, bem delimitados e de padrão misto com predomínio de infiltrado linfocitário (Figura 25, Tabela 3 e Apêndice 1). Em relação à presença de bacilos foi feita uma busca minuciosa e foi observada quantidade pequena de bacilos em alguns dos poucos granulomas, sendo que a maior parte das áreas de granulomas estavam livres de bacilos (Figura 26). Esse foi um resultado muito interessante e embora não se tenha o resultado do número de UFC, analisando os cortes histológicos é possível inferir que os animais imunizados com a formulação contendo Hsp65a+KLK possivelmente apresentaram uma carga bacilar reduzida em relação aos outros grupos. Isso porque a área com presença de granulomas foi muito menor e, além disso, nem toda área de granuloma apresentava bacilos. É preciso salientar ainda, que a proteção, medida pela eliminação ou redução da carga bacilar, deve ser acompanhada da recuperação do processo inflamatório desencadeado para eliminação do patógeno. Assim, a formulação vacinal contendo Hsp65a+KLK é capaz de induzir uma resposta que reduz a carga bacilar e ao mesmo tempo preserva e até recupera o parênquima pulmonar infectado.

**Tabela 3:** Análise dos cortes histológicos do pulmão de animais infectados por *Mycobacterium tuberculosis* por via intratraqueal 30 ou 90 dias após a vacinação com microesferas contendo rHsp65a e diferentes imunoestimulantes

Formulações	Infecção 30 dias após a vacinação							Infecção 90 dias após a vacinação						
	salina	vazia	P	K	H	H+P	H+K	salina	vazia	P	K	H	H+P	H+K
<b>Comprometimento do parênquima pulmonar (%)</b>	60-70	10-40	20-50	20-30	20-40	30-50	5-20	< 5	5-20	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
<b>Quantidade de bacilos</b>	+++	+++	+	++	++	++	+	*	*	+	+	*	+	+

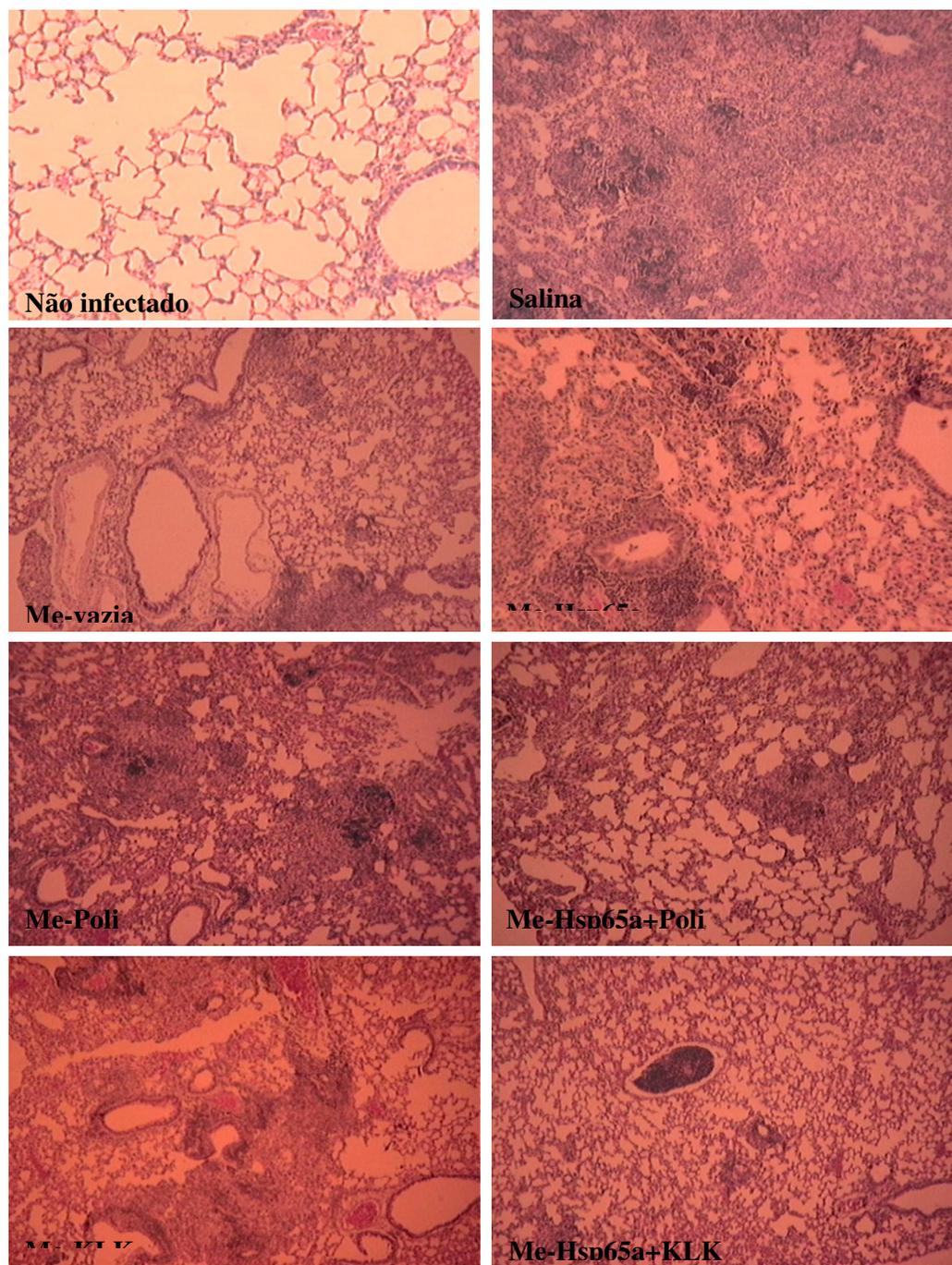
P: Me-Poliarginina; K: Me-KLK; H: Me-Hsp65a; H+P: Me-Hsp65a+Poliarginina, H+K: Me-Hsp65a+KLK.

\*não foram encontrados bacilos nos cortes analisados

+ pouca

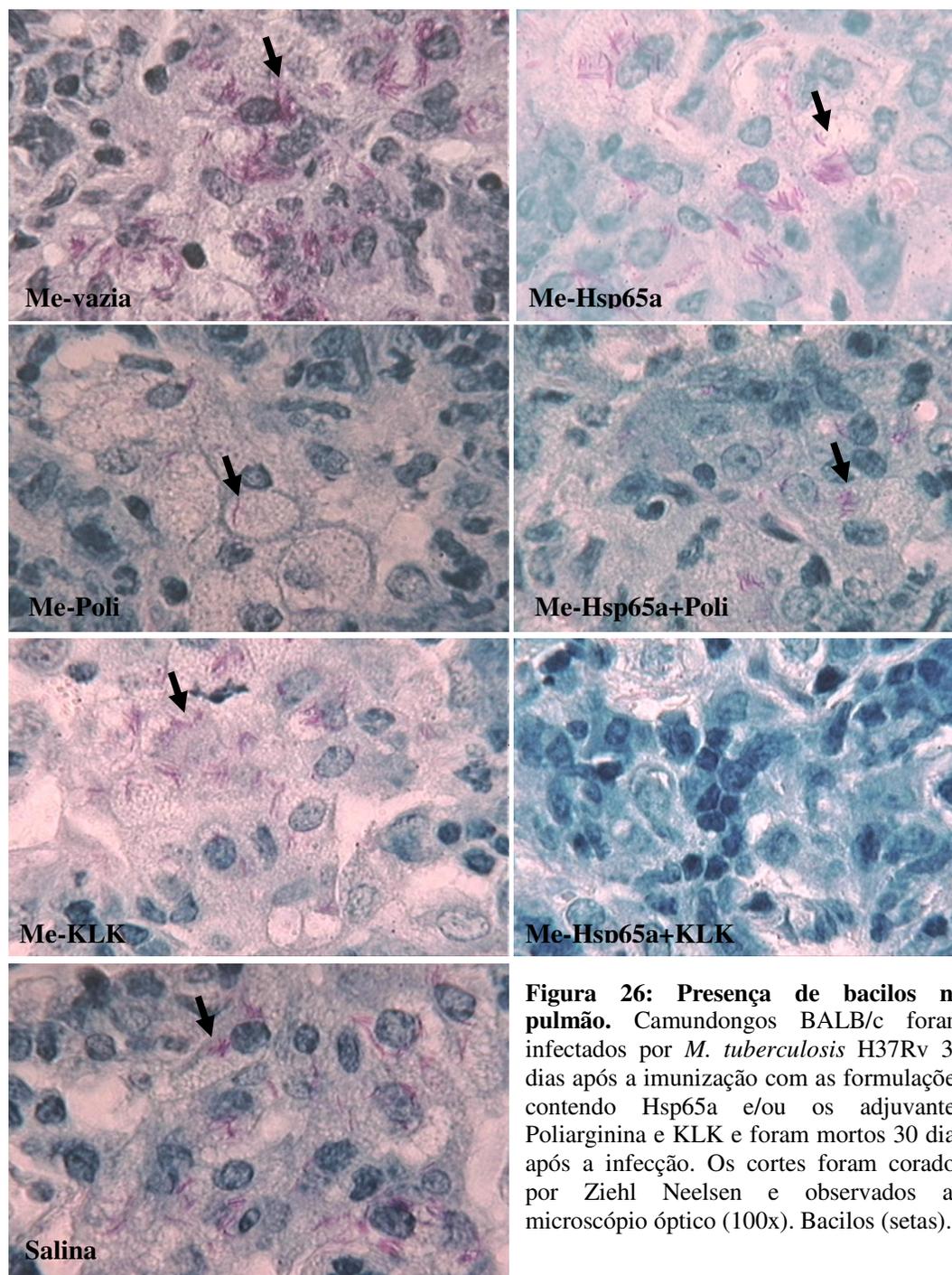
++ moderada

+++ grande



**Figura 25:** Cortes histológicos de pulmão. Camundongos BALB/c foram infectados por *M. tuberculosis* H37Rv 30 dias após a imunização com as formulações contendo Hsp65a e/ou os adjuvantes Poliarginina e KLK e foram mortos 30 dias após a infecção. Os cortes foram corados por hematoxilina e eosina (HE) e observados ao microscópio óptico (10x).

Erro!



Os resultados acima descritos mostram uma situação onde se utilizou a proteína menos purificada (Hsp65a), entretanto, interessa-nos bastante a resposta desencadeada para as formulações contendo a proteína mais purificada (Hsp65b). A análise mais detalhada dos cortes de pulmão está descrita no Apêndice 2.

Conforme mostrado na Figura 27 (Tabela 4) o pulmão de animais infectados após 30 dias da imunização com salina apresentou um comprometimento do parênquima pulmonar que variou entre 40 e 60% e padrão misto de granulomas tendo sido observado um infiltrado perivascular e peribronquial linfocitário e reação macrofágica fora dessas áreas. A maioria dos granulomas observados estavam isolados e a análise das lâminas coradas por Ziehl Neelsen mostrou a presença de moderada quantidade de bacilos nas áreas onde se concentram macrofágos nos granulomas (Figura 28). Os pulmões dos animais que receberam microesferas vazias apresentaram comprometimento entre 20 e 40%, Poliarginina entre 40 e 50%, KLK entre 60 a 70% e CpG 70 a 75% (Figura 27 e Tabela 4). Em todos esses grupos observou-se a presença de granulomas isolados e confluentes de padrão misto (linfocitário e macrofágico). O grupo que recebeu KLK apresentou quantidade moderada de bacilos e para as microesferas vazias, Poliarginina ou CpG foram observadas grandes quantidades de bacilos nas áreas de granulomas (Figura 28). O comprometimento do parênquima pulmonar em animais imunizados com a formulação de Hsp65b variou entre 10 a 85%, os granulomas observados foram isolados ou confluentes de padrão misto e com predomínio de infiltrado macrofágico (Figura 27 e Tabela 4). Também foi observada moderada presença de bacilos nas áreas de granulomas nesse grupo (Figura 28). O grupo imunizado com microesferas contendo Hsp65b+Poliarginina apresentou um comprometimento do parênquima pulmonar variando entre 10 a 60%, presença de granulomas confluentes e isolados com padrão misto de infiltrado celular (Figura 27). Para a formulação Hsp65b+CpG observou-se um comprometimento de 45 a 50% do parênquima pulmonar, presença de granulomas isolados de padrão misto com grandes focos linfocitários mas predomínio macrofágico (Figura 27) e moderada quantidade de bacilos (Figura 28). O melhor resultado foi obtido com a formulação Hsp65b+KLK em que se observou um comprometimento do parênquima pulmonar variando entre 5 e 15%, presença de granulomas pequenos e isolados, não confluentes e bem delimitados (Figura 27) similar ao resultado mostrado na Figura 25 para o grupo Hsp65a+KLK. Em relação à presença de bacilos observou-se uma pequena quantidade deles no pulmão mais comprometido e, raros em algumas outras amostras, sendo que a maior parte das áreas de granulomas estava livre de bacilos (Figura 28). Esse foi um resultado muito interessante e corrobora com as observações do número de UFC (Figura 24).

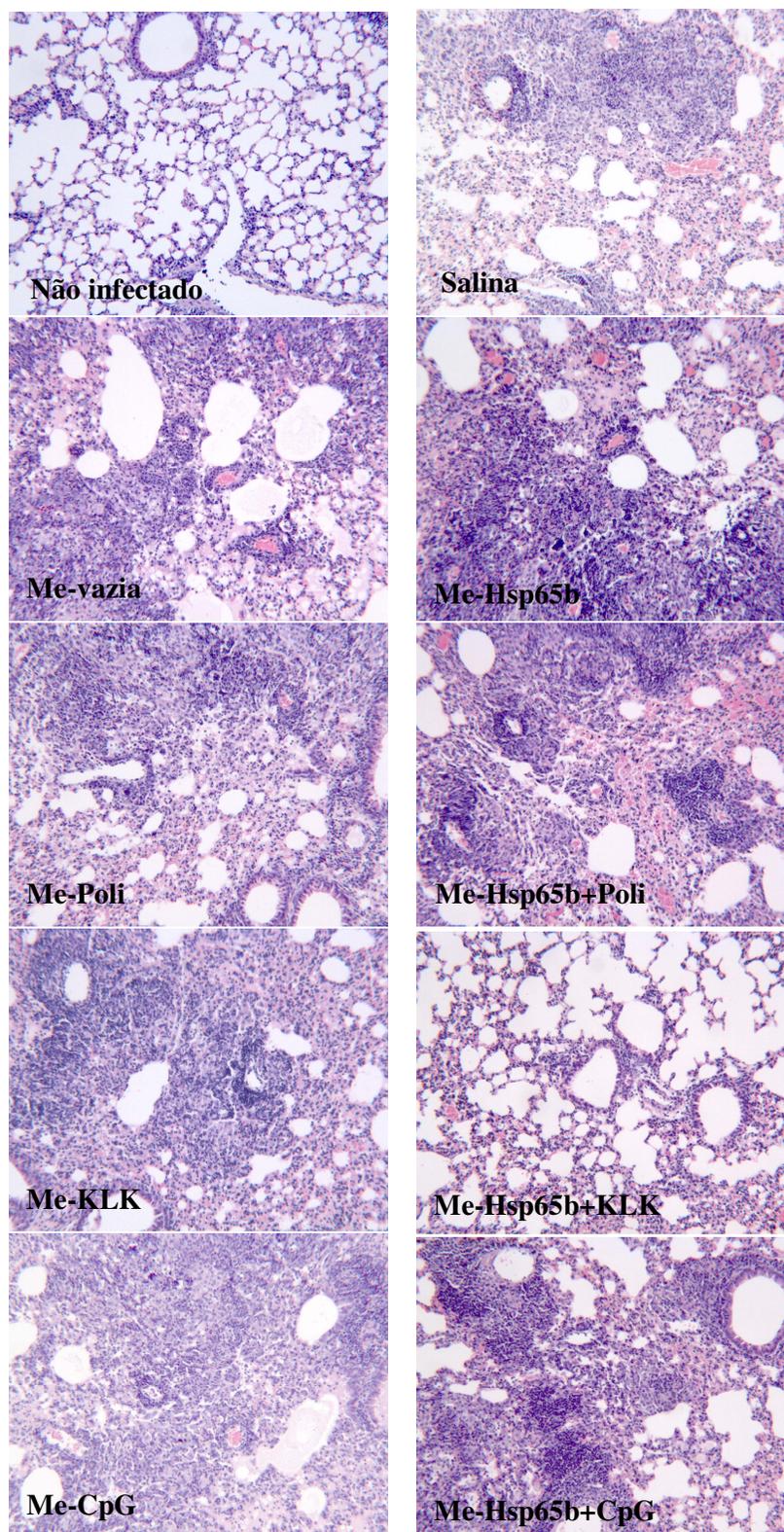
Animais infectados 90 dias após a vacinação também foram avaliados. Conforme mostrado na Figura 29 e Tabela 4, os animais que receberam salina apresentam um comprometimento de 50 a 60% do parênquima pulmonar e infiltrado celular semelhante ao descrito para os grupos salina de outros experimentos (Figuras 25 e 27). A análise das lâminas coradas por Ziehl Neelsen mostrou a presença de moderada quantidade de bacilos nas áreas onde se concentram macrofágos nos granulomas (Figura 30). Os pulmões dos animais que receberam microesferas vazias apresentaram comprometimento entre 20 e 35%, Poliarginina entre 50 e 65%, KLK entre 25 a 30% e CpG entre 40 a 60% de comprometimento do parênquima pulmonar (Figura 29 e Tabela 4). Nesses grupos observou-se a presença de granulomas isolados (Poliarginina e microesferas vazias) e confluentes (salina, KLK e CpG) de padrão misto (linfocitário e macrofágico) e uma pequena quantidade de bacilos (Figura 30). O comprometimento do parênquima pulmonar de animais imunizados com a formulação Hsp65b foi cerca de 30%, caracterizando-se pela presença de granulomas isolados de padrão misto e com predomínio de infiltrado macrofágico (Figura 29 e Tabela 4). Também foi observada moderada presença de bacilos nas áreas de granulomas (Figura 30). O grupo imunizado com a formulação Hsp65b+Poliarginina apresentou um comprometimento do parênquima pulmonar variando entre 10 a 20% e granulomas isolados com padrão misto de infiltrado celular (Figura 29). Para a formulação Hsp65b+CpG observou-se um comprometimento de 5 a 25% do parênquima pulmonar, presença de granulomas isolados de padrão misto com grandes focos linfocitários mas predomínio macrofágico e moderada quantidade de bacilos. O grupo Hsp65b+KLK apresentou um comprometimento do parênquima pulmonar entre 0 e 40%, além disso, observou-se a presença de granulomas isolados e raros granulomas confluentes, sendo os mesmos de padrão misto (Figura 29). Em relação à presença de bacilos foi observada quantidade moderada de bacilos no pulmão (Figura 30).

Esses resultados corroboram com os dados sobre a recuperação de bacilos do pulmão de animais vacinados. É importante salientar que de forma geral o comprometimento do parênquima pulmonar foi menor se comparado ao experimento utilizando a proteína menos purificada (Hsp65a), isso deve estar relacionado a menor recuperação de bacilos (Figura 24) se comparada aos resultados do experimento anterior, mostrado na Figura 23.

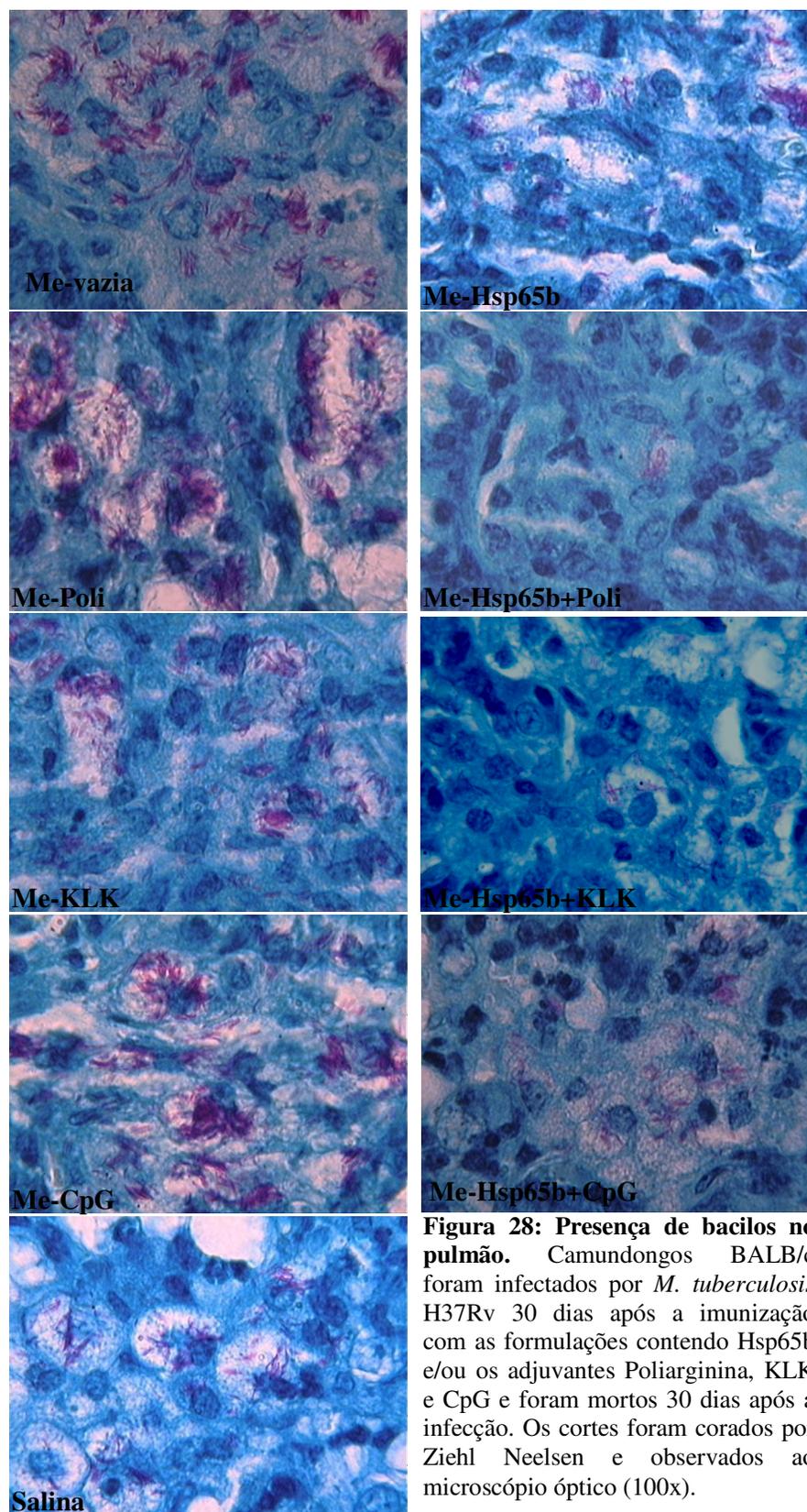
**Tabela 4:** Análise dos cortes histológicos do pulmão de animais infectados por *Mycobacterium tuberculosis* por via intratraqueal 30 ou 90 dias após a vacinação com microesferas contendo rHsp65b e diferentes imunoestimulantes

Formulações	Infecção 30 dias após a vacinação									Infecção 90 dias após a vacinação								
	S	V	P	K	C	H	H+P	H+K	H+C	S	V	P	K	C	H	H+P	H+K	H+C
<b>Comprometimento do parênquima pulmonar (%)</b>	40-60	20-40	40-50	60-70	70-75	10-85	10-60	5-15	45-50	50-60	20-35	50-65	25-30	40-60	30	10-20	0-40	5-25
<b>Quantidade de bacilos</b>	++	+++	+++	++	+++	++	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+

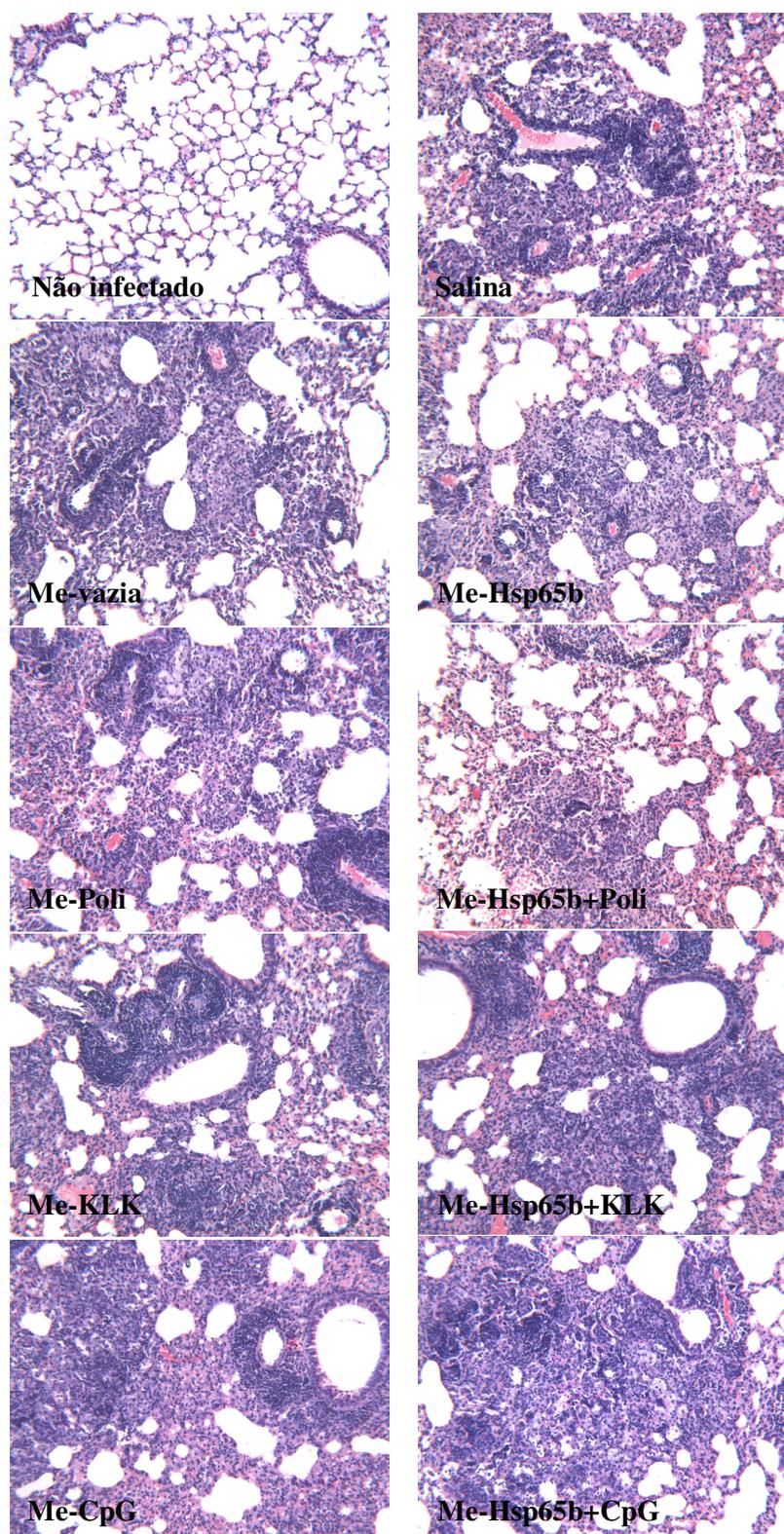
S: salina; V: Me-vazia; P: Me-Poliarginina; K: Me-KLK; H: Me-Hsp65b; H+P: Me-Hsp65b+Poliarginina, H+K: Me-Hsp65b+KLK; H+C: Me-Hsp65b+CpG.  
+ pouca; ++ moderada; +++ grande.



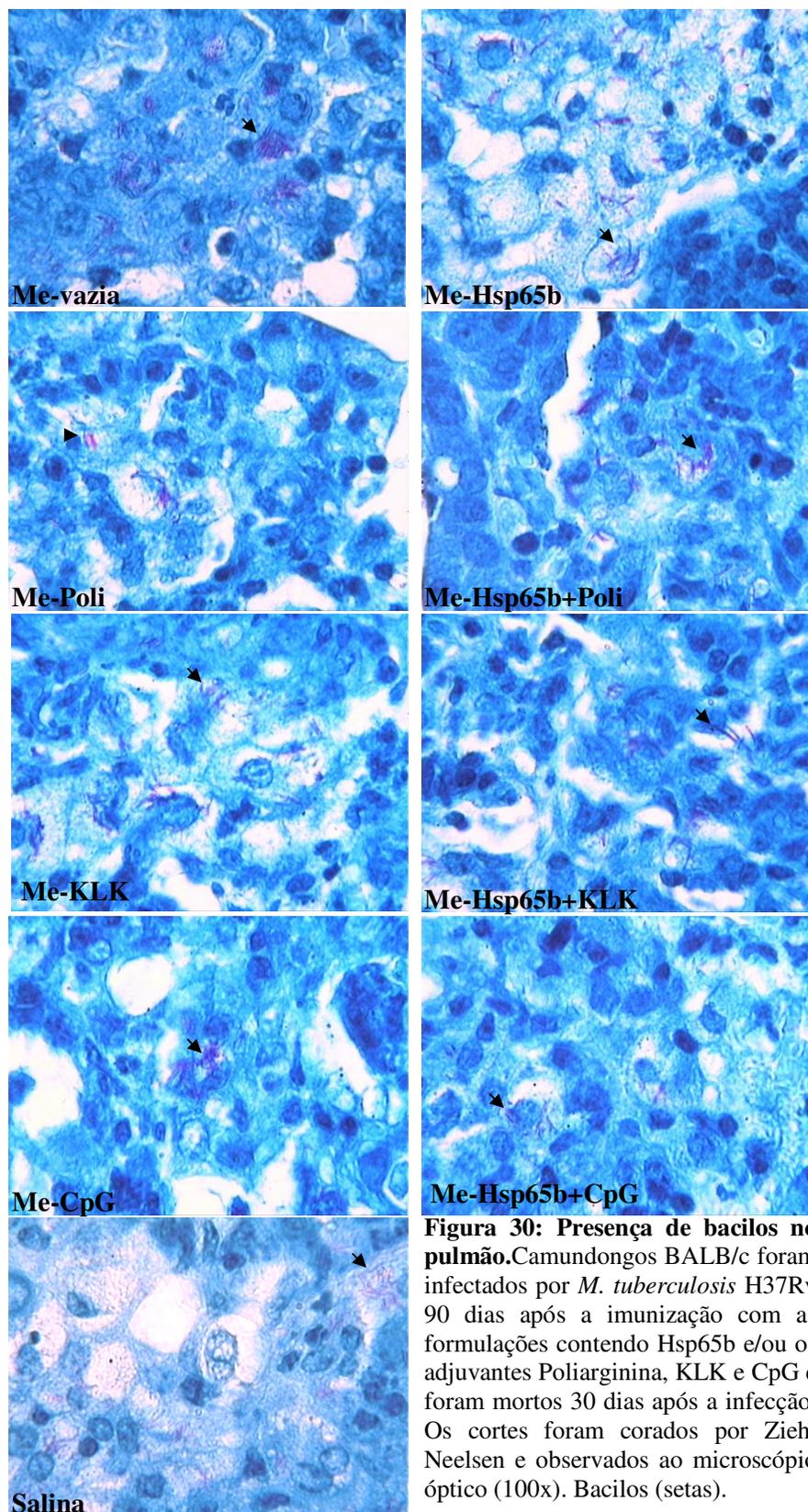
**Figura 27:** Cortes histológicos de pulmão. Camundongos BALB/c foram infectados por *M. tuberculosis* H37Rv 30 dias após a imunização com as formulações contendo Hsp65b e/ou os adjuvantes Poliarginina, KLK e CpG 1668 e foram mortos 30 dias após a infecção. Os cortes foram corados por hematoxilina e eosina (HE) e observados ao microscópio óptico (10x).



**Figura 28: Presença de bacilos no pulmão.** Camundongos BALB/c foram infectados por *M. tuberculosis* H37Rv 30 dias após a imunização com as formulações contendo Hsp65b e/ou os adjuvantes Poliarginina, KLK e CpG e foram mortos 30 dias após a infecção. Os cortes foram corados por Ziehl Neelsen e observados ao microscópio óptico (100x).



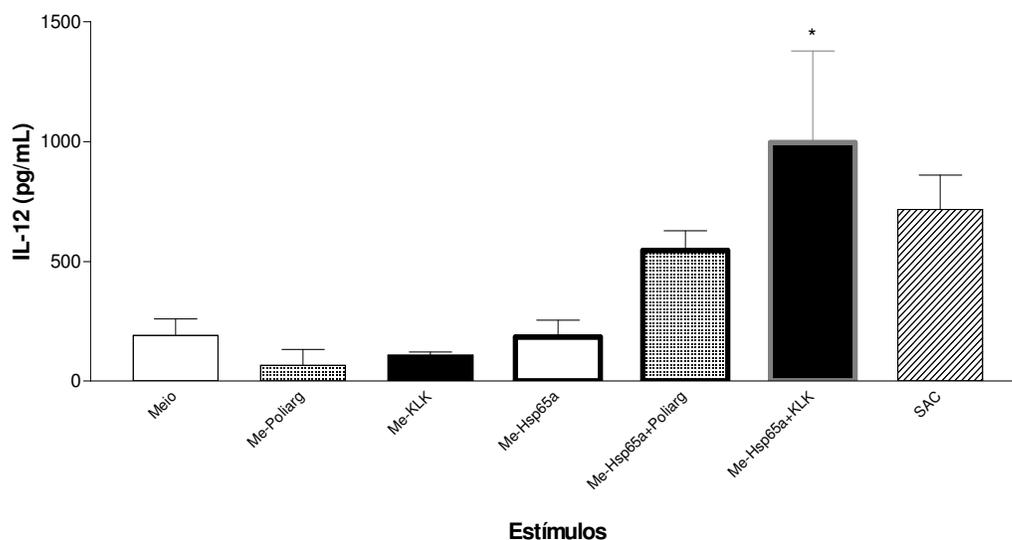
**Figura 29:** Cortes histológicos de pulmão. Camundongos BALB/c foram infectados por *M. tuberculosis* H37Rv 90 dias após a imunização com as formulações contendo Hsp65b e/ou os adjuvantes Poliarginina, KLK e CpG 1668 e foram mortos 30 dias após a infecção. Os cortes foram corados por hematoxilina e eosina (HE) e observados ao microscópio óptico (10x).



**Figura 30: Presença de bacilos no pulmão.** Camundongos BALB/c foram infectados por *M. tuberculosis* H37Rv 90 dias após a imunização com as formulações contendo Hsp65b e/ou os adjuvantes Poliarginina, KLK e CpG e foram mortos 30 dias após a infecção. Os cortes foram corados por Ziehl Neelsen e observados ao microscópio óptico (100x). Bacilos (setas).

### 4.3 – Eventos imunológicos iniciais desencadeados pela administração das formulações vacinais

As respostas protetoras contra tuberculose experimental estão associadas ao padrão Th1 de resposta imune. Nossos resultados revelaram que dentre as formulações avaliadas a que contém Hsp65+KLK é a mais promissora, como candidata à vacina de subunidade contra TB. Os ensaios realizados com células de baço re-estimuladas ou células dos linfonodos drenantes do sítio de injeção das vacinas não foram completamente esclarecedores sobre o padrão de resposta induzida por essa formulação. As respostas avaliadas 30 ou 90 dias após a vacinação retratam um momento importante da resposta imune quando os mecanismos de proteção já estão estabelecidos. Entretanto, apesar da resposta nesse momento ser importante para compreensão dos mecanismos desencadeados após a injeção das formulações vacinais é necessário entender o que acontece logo após a injeção das formulações no sítio de administração. Assim, os eventos iniciais podem ser determinantes para o sucesso de uma vacina. As microesferas aqui estudadas apresentaram um diâmetro médio <10um o que faz com que sejam passíveis da captura por células fagocíticas. Assim, após a injeção das formulações vacinais as células fagocitárias devem ser uma das principais células a entrar em contato com a vacina. Assim, para avaliar a capacidade das formulações em estimular macrófagos, foi realizado ensaio *in vitro* onde macrófagos de linhagem tumoral (J774) foram incubados por 48 horas na presença das diferentes formulações da vacina. Após esse período o sobrenadante foi colhido e a concentração de IL-12 foi avaliada. Essa citocina tem papel importante no desenvolvimento de respostas imunes de padrão Th1 e, como discutiremos adiante, esse padrão de resposta está associado à proteção no nosso modelo de estudo. A Figura 31 mostra que a formulação contendo Hsp65a+KLK foi a que induziu maiores níveis de IL-12. A formulação contendo Hsp65a+Poliarginina também induziu a produção de quantidade importante de IL-12 comparando-se aos níveis induzidos pela formulação contendo apenas Hsp65a. Isso sugere que *in vivo* essas formulações também possam estar criando um microambiente rico em IL-12 o que favoreceria o desenvolvimento de uma resposta Th1 específica e, portanto, uma resposta associada à proteção.

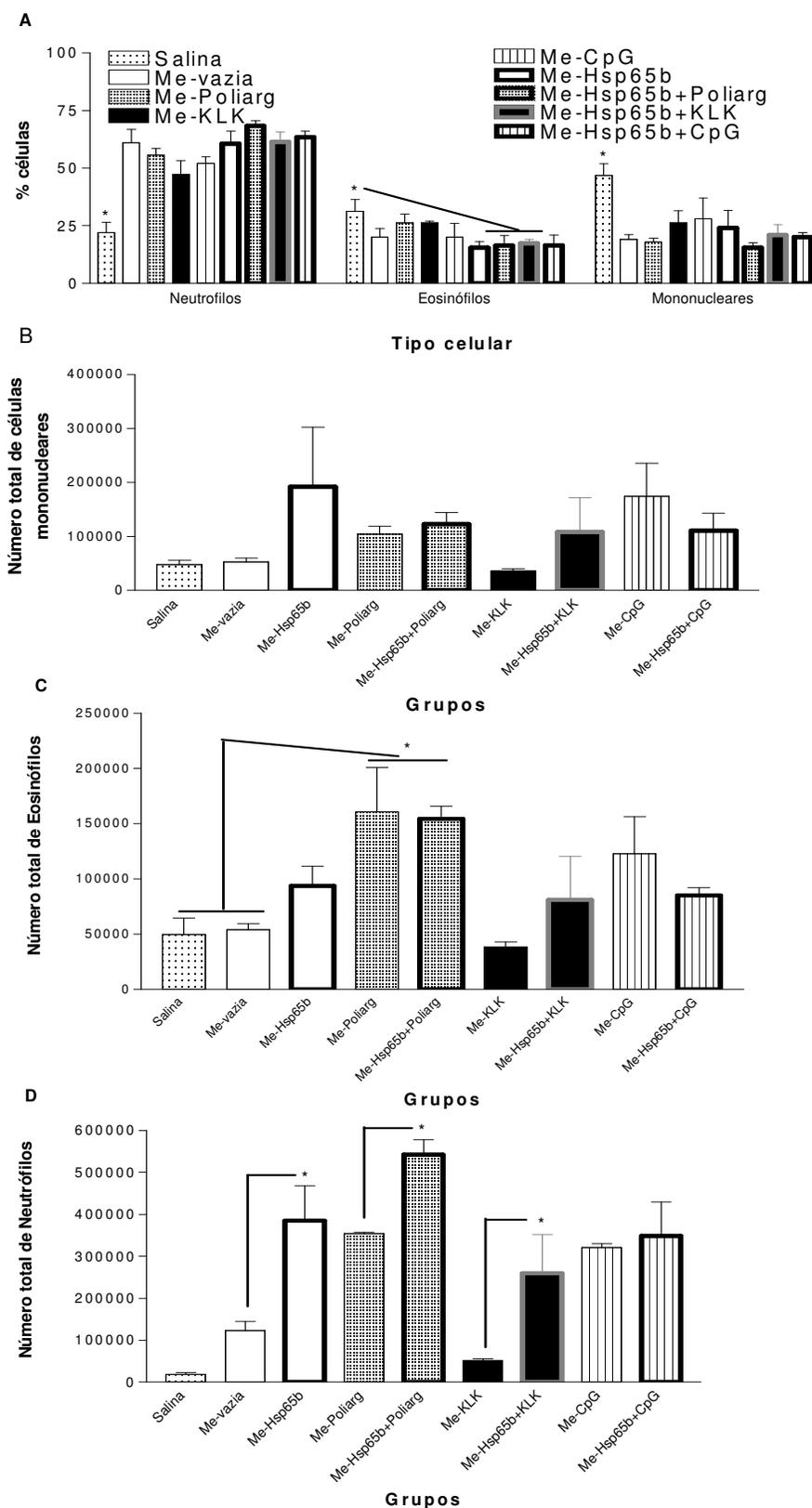


**Figura 31: IL-12 induzida “in vitro”.** Macrófagos da linhagem J774 foram estimulados *in vitro* com as formulações de microesferas na proporção de 2 partículas para 1 célula e após 48 horas de incubação a 37°C o sobrenadante foi recolhido e separado para a quantificação de IL-12 por ELISA. (\* $p < 0,05$ , diferente em relação a Me-Hsp65a e Me-KLK)

Outra forma de tentar compreender os mecanismos iniciais envolvidos nas respostas desencadeadas pelas formulações foi a determinação dos possíveis tipos celulares recrutados para o local da injeção da vacina. Para a realização desse estudo foi feita uma bolha artificial no dorso de animais BALB/c, onde se injetaram as formulações vacinais. Após 24 horas dessa injeção foi feita uma contagem diferencial dos tipos celulares recrutados para o microambiente da bolha. Conforme se pode observar na Figura 32A, a maior parte das células que migraram para a bolha após 24 horas da administração das formulações foram os neutrófilos. A porcentagem dessas células aumentou de forma significativa em relação ao grupo controle que recebeu somente salina, isso deve estar relacionado a constituição da própria partícula (microesfera). Interessantemente, quando se avalia o número total de neutrófilos na bolha, observa-se que existe menos neutrófilos no grupo controle em relação a todos os outros grupos, e que nos grupos que receberam as formulações contendo Hsp65b, Hsp65b+Poliarginina ou Hsp65b+KLK o recrutamento dessas células foi maior que nos seus respectivos controles. Isso sugere um possível papel da Hsp65 ou do LPS no recrutamento de células (Figura 32A). A porcentagem de eosinófilos reduziu de forma significativa nos grupos que receberam as formulações contendo Hsp65b quando comparado ao grupo controle

(salina), entretanto, não se observou mudança significativa no número absoluto dessas células entre os grupos estudados apenas uma tendência em aumento no grupo Hsp65+KLK em relação ao seu controle, KLK (Figuras 32B e 32C). Em relação às células mononucleares o que se observa é que o grupo que recebeu salina como estímulo, apresenta o maior percentual dessas células em relação aos demais grupos e que em número absoluto não existe nenhuma associação relevante entre esses dados (Figuras 32A e 32B).

Nesse estudo observou-se, portanto, um recrutamento preferencial de neutrófilos na presença das formulações contendo Hsp65b.



**Figura 32: Estudo de migração celular.** As formulações vacinais foram injetadas dentro de uma bolha asséptica criada no dorso de camundongos BALB/c. 24 horas após sua administração os animais foram mortos, a bolha foi lavada com PBS estéril e a suspensão de células foi corada por Rosenfeld e contada. A) Porcentagem de células; B) Número total de células mononucleares; C) Número total de eosinófilos e D) Número total de neutrófilos. \* $p < 0,05$

## **5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**

Nas últimas décadas, os avanços na tecnologia para a pesquisa e desenvolvimento de vacinas permitiram a introdução de novas estratégias para a obtenção e produção de antígenos, assim como foram otimizadas novas maneiras de se administrar e apresentar esses antígenos para as células do sistema imune. Essas estratégias abriram caminhos para inovações, particularmente no contexto do desenvolvimento de vacinas mais seguras, eficazes e polivalentes.

No caso da tuberculose a grande variabilidade na proteção conferida pelo BCG, vacina de uso corrente contra a TB, o aumento no número de casos da doença, o aparecimento de bacilos resistentes a múltiplas drogas, entre outras coisas, motivaram a busca por uma vacina mais eficaz contra TB, mais eficiente que o BCG, barata, segura e de preferência para a administração em uma única dose. Assim, formulamos como proposta nesse trabalho o desenvolvimento de vacinas de subunidade baseadas em microesferas biodegradáveis contendo a proteína Hsp65 e um dos adjuvantes imunoestimulantes (KLK, poliarginina ou CpG 1668) para o combate contra a TB.

A preocupação em se formular vacinas mais seguras também passa pela etapa de purificação do antígeno vacinal, principalmente no que tange à questão da remoção de endotoxinas (LPS). O LPS é um dos constituintes da parede de bactérias gram-negativas e pode contaminar produtos biológicos como as proteínas recombinantes purificadas a partir de sistema de expressão bacteriano. A necessidade de remoção do LPS fundamenta-se no fato de que esse contaminante atua como um adjuvante com propriedades imunomoduladoras para respostas do tipo Th1 mas em níveis elevados é tóxico para o organismo (AGGARWAL, 1980; GLAUSER *et al*, 1991). Atualmente, tem se buscado uma alternativa menos tóxica para o LPS e esse é o caso do adjuvante monofosforil lípide A (MPL), um derivado do próprio LPS que vem sendo utilizado em alguns testes clínicos (PERSING *et al*, 2002). No que concerne a presença de endotoxinas a Farmacopéia Européia preconiza que os seus níveis não ultrapassem o limite de 5EU/Kg/hora para medicamentos administrados por via endovenosa. A preocupação com a presença de endotoxinas em soluções injetáveis não é recente. Entretanto, em se tratando de vacinas em estudo pré-clínico, é possível verificar que muitos pesquisadores têm publicado resultados de trabalhos realizados com proteínas recombinantes, expressas em sistema bacteriano, sem mencionar a quantificação desse contaminante. Além disso, recentemente vem se mostrando que efeitos atribuídos inicialmente a alguns antígenos foram mal interpretados e na verdade resultavam da presença de quantidades significativas de LPS como contaminante. Em 2005, Vanlandschoot e colaboradores publicou um trabalho onde mostrou que a resposta induzida contra o nucleocapsídeo do vírus da Hepatite B

atribuída ao mesmo era uma resposta inespecífica, induzida pela presença de endotoxina proveniente do sistema de expressão da proteína utilizada, o bacteriano. Além, disso esses resultados dão subsídios para o questionamento da validade de outros estudos realizados anteriormente. Pepys e colaboradores (2005) também questionaram recentemente os efeitos pro-inflamatórios atribuídos à proteína C-reativa humana recombinante. Em 2002 a capacidade da proteína Hsp70 de ativar diretamente APC também foi questionada e demonstrou-se que esse efeito era devido a presença de quantidades significativas de endotoxina na solução da proteína estudada (BAUSINGER *et al*, 2002).

No presente trabalho, a remoção mesmo que parcial do LPS da solução de proteína Hsp65a utilizada nas formulações vacinais foi um de nossos primeiros objetivos. Isso porque, inicialmente, a proteína vinha sendo parcialmente purificada por um sistema de simples precipitação com sulfato de amônio gerando um produto com contaminantes protéicos e altos níveis de contaminação por endotoxina (Figura 1).

Várias metodologias foram desenvolvidas para a remoção de endotoxinas de produtos biológicos como adsorção física ao carvão, ultrafiltração (TOYO-SODA, 1989; LI & LUO, 1998), cromatografia de afinidade (DING *et al*, 2001; HIRAYAMA *et al*, 1999), troca iônica em membrana (BELANICH *et al*, 1996) ou filtro (HOU & ZANIEWSKI, 1990), extração (CENTOCOR, 1988; AIDA & PABST, 1990) ou gradiente de centrifugação com sacarose (TAKEDA, 1988). A primeira ferramenta disponível foi o tratamento da proteína purificada com o detergente Triton X-114 (AIDA & PABST, 1990). Esse tratamento removeu cerca de 100 vezes a quantidade de endotoxina inicial, porém o rendimento da purificação após essa etapa foi bastante reduzido.

Para avaliar os efeitos da remoção do LPS da proteína foram preparadas formulações vacinais com Hsp65a ou com Hsp65a tratada com triton X-114. Essas formulações foram administradas a camundongos BALB/c, por via intramuscular, e 35 dias após a imunização foram avaliadas as respostas imunes celular e humoral induzidas. A remoção parcial do LPS da proteína purificada, que correspondeu a mais de 100 vezes, promoveu uma mudança significativa na resposta imune induzida por formulações de microesferas contendo essa proteína. A razão IgG2a/IgG1 para a formulação com maior quantidade de LPS mostrou a indução preferencial de uma resposta imune de padrão Th1 em relação a proteína menos contaminada. A produção de IFN- $\gamma$  e a proliferação celular também foram maiores nos animais que receberam a formulação contendo a proteína mais contaminada por LPS (Figura 2). Esses resultados reforçaram ainda mais a necessidade de se remover o LPS, mesmo que parcialmente. Apesar da técnica de purificação com detergente ter sido eficiente em reduzir o

LPS da solução de Hsp65a, a completa remoção do detergente desta solução não foi alcançada. Apesar de não ter sido tóxica nos ensaios *in vivo*, a sua utilização em estudos *in vitro* para re-estimular as células em cultura celular tornou-se inviável pela toxicidade apresentada devido à presença do detergente.

Outro motivo que nos levou a buscar uma alternativa para purificar a proteína Hsp65a foi o fato de ter-se observado, em registros do laboratório, que ao longo do tempo a expressão da proteína Hsp65 foi sendo reduzida e com isso a proporção de contaminantes aumentou. É possível que alguma modificação na bactéria transformante armazenada em freezer possa ter favorecido à redução da expressão da proteína. Entretanto, não se pode descartar que alguma mudança nas condições de crescimento também tenham interferido, como as condições de aeração e temperatura de crescimento, por exemplo. Além disso, o tratamento dessa proteína com Triton X-114, apesar de reduzir o LPS, não auxiliou na remoção de outras proteínas contaminantes.

Diante desses resultados foi necessário utilizar uma outra estratégia para obter a proteína Hsp65. Assim, a fim de melhorar a purificação o gene da proteína Hsp65 foi clonado no vetor de expressão pET28a, que insere uma cauda de histidina na proteína a ser expressa, possibilitando sua purificação por cromatografia de afinidade por metal. Essa estratégia foi eficiente não só para remover parcialmente a endotoxina da proteína recombinante em cerca de 100 vezes como também, removeu outras proteínas de origem bacteriana que contaminavam a proteína purificada anteriormente (Figuras 1 e 4B). Antes de iniciar os experimentos em animais foi feita a caracterização da proteína para a certificação de que a nova construção seria capaz de levar à expressão de uma proteína Hsp65b semelhante àquela anteriormente utilizada (Figuras 3-6). Após o sequenciamento, a identificação da proteína e expressão em níveis elevados concluiu-se que a clonagem foi bem sucedida e que o clone analisado deveria ser armazenado na forma de um banco de células de referência (BCR) e de trabalho (BCT) para garantir a reprodutibilidade do processo de purificação.

A obtenção da proteína Hsp65 com menor quantidade de LPS (Hsp65b) foi alcançada após um único passo de purificação por cromatografia de afinidade e a partir daí foram formuladas as vacinas. Para compreender as respostas induzidas pelas formulações e o efeito do LPS também foram feitas formulações com a proteína menos purificada e sem tratamento com Triton X-114 (Hsp65a) isso porque essa última vinha sendo utilizada nos estudos do laboratório há muito tempo e seria um parâmetro melhor de comparação.

Após a etapa de formulação das vacinas seguiu-se a sua caracterização. Dessa análise concluiu-se que todas as formulações vacinais preparadas apresentaram o perfil adequado

para o estudo. A proteína Hsp65 foi encapsulada nas diferentes formulações (cerca de 1 µg/mg), conforme pode ser observado após a solubilização e liberação da proteína das formulações vacinais e análise em gel (Figuras 7 e 8). Esse resultado sugere um limite de encapsulamento da proteína nas formulações de microesferas. As taxas de encapsulamento foram baixas e, em relação à proteína Hsp65a, a taxa de encapsulamento de Hsp65b foi menor ainda. É preciso ressaltar que a quantidade de proteína Hsp65a em solução sempre foi menor que a da solução de Hsp65b, em função da presença de proteínas contaminantes na solução de Hsp65a. Nossa experiência com outras proteínas recombinantes tem mostrado que a taxa de encapsulamento de uma proteína menos purificada é maior, mesmo quando quantidades maiores da proteína mais purificada são utilizadas na formulação. A solução de Hsp65b apresentou uma característica que talvez tenha contribuído para essa taxa de encapsulamento, a baixa solubilidade. O encapsulamento envolve passos de homogeneização em altas rotações e esse processo pode ter favorecido a agregação da Hsp65b em solução concentrada (3mg/200µL). Isso explicaria porque quantidades similares de Hsp65 foram encapsuladas enquanto quantidades diferentes de proteína em solução foram utilizadas para formular as vacinas. Caso alguma dessas formulações venha a ser produzida em maior escala será necessário otimizar o processo de encapsulamento. Além disso, também será necessário quantificar os adjuvantes encapsulados nas formulações para verificar a eficiência de encapsulamento e mesmo para melhor compreender a resposta desencadeada pelas diferentes formulações.

Outro parâmetro avaliado foi o tamanho das partículas e o que se observou foi que todas as formulações apresentaram um tamanho médio ( $D_{4,3}$ ) menor que 10µm, o que é adequado para a sua captura por APCs. Apesar dessa característica o Span das formulações (polidispersidade) mostradas na Tabela 1 (as quais incluem as formulações contendo Hsp65a) foi menor em relação ao grupo de formulações elencadas na Tabela 2 (as quais incluem as formulações contendo Hsp65b). Isso mostrou que a faixa de distribuição de tamanho das partículas descritas na Tabela 1 foi menor que aquela observada para as partículas mostradas na Tabela 2. Essa característica não deve estar relacionada à diferença de pureza das proteínas utilizadas porque a polidispersidade das partículas descritas na Tabela 1 foi menor inclusive em formulações contendo apenas os adjuvantes. Entretanto, pequenas diferenças no momento de formular as partículas podem ter interferido nesse resultado. Vale ressaltar, por exemplo, que as formulações descritas na Tabela 1 foram preparadas com um homogeneizador que apresentava um controle mais fino da rotação em comparação ao utilizado para formular as partículas descritas na Tabela 2.

O tamanho é uma característica fundamental para a adjuvantividade das microesferas. Isto ocorre porque esferas com diâmetro na faixa de 1 a 10  $\mu\text{m}$  são muito grandes para entrar 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 APCs. Já as partículas com diâmetro maior que 10  $\mu\text{m}$  seriam responsáveis pela formação de um depósito e pela liberação do antígeno por um período prolongado (CLELAND, 1995; O'HAGAN *et al*, 1993). Desta forma, formulações com o tamanho entre 1 e 10  $\mu\text{m}$ , conforme obtivemos, poderiam facilitar a apresentação da Hsp65 encapsulada ao sistema imune e, além disso, a possibilidade da liberação da mesma dentro da célula poderia favorecer a resposta do tipo Th1, induzindo tanto T CD4 quanto células T CD8. Trabalhos publicados na literatura têm explorado bastante essa característica das microesferas, e isso tem sido muito útil no desenvolvimento de vacinas (WAECKERLE-MEN *et al*, 2005).

Quanto a presença de endotoxina observou-se que as formulações contendo a proteína Hsp65b apresentaram níveis de contaminação por endotoxinas compatíveis com aqueles preconizados e descritos na Farmacopéia Européia, entretanto, as formulações contendo a proteína Hsp65a apresentaram um nível maior (Tabelas 1 e 2).

Após a caracterização das formulações seguiu-se para o estudo da imunogenicidade. Nesses experimentos observou-se que os adjuvantes não interferiram na resposta humoral específica contra Hsp65a. A produção de anticorpos anti-Hsp65 não foi modificada pela adição dos adjuvantes às formulações contendo a proteína recombinante menos purificada (Figuras 11A e 11B), talvez pela sobreposição do efeito do LPS presente em grande quantidade nessas formulações (Tabela 1). Além disso, a razão IgG2a/IgG1 foi similar entre os grupos e próxima de 1 (Figura 11C) 30 dias após a imunização e aumentou significativamente para a formulação de Hsp65a+Poliarginina 90 dias após a imunização. A razão entre IgG2a/IgG1 serve como um parâmetro complementar para se discutir o padrão de resposta imune induzida. Usualmente, quando a razão IgG2a/IgG1 é maior que 1 diz-se que a resposta tende a um padrão Th1 e, quando é menor que 1, tende a resposta de padrão Th2. Embora o grupo que recebeu Hsp65a+KLK tenha apresentado uma razão IgG2a/IgG1 um pouco maior que 1 aos 30 dias da imunização essa diferença não foi estatisticamente significativa em relação ao controle (Hsp65a). Além disso, observou-se que a razão IgG2a/IgG1 diminuiu ao longo do tempo (de 30 para 90 dias), sugerindo uma possível mudança de tendência na resposta, mas não a diminuição dos níveis de anticorpos, uma vez que os títulos foram maiores que aqueles determinados aos 30 dias

da imunização (Figuras 11A e 11B). A remoção parcial de endotoxina da proteína Hsp65 promoveu mudanças significativas na resposta imune induzida pelas formulações. A razão IgG2a/IgG1 após 30 dias da imunização foi menor que 1 para todos os grupos que receberam Hsp65b e somente após 90 dias essa razão IgG2a/IgG1 aumentou, sendo maior ou igual a 1 (Figura 12). Nesse caso a razão determinada para as formulações de Hsp65b ou de Hsp65b+CpG foram significativamente maiores que os seus respectivos grupos avaliados após 30 dias da imunização. Isso ressalta a tendência da formulação contendo o CpG em induzir uma resposta imune do tipo Th1. Esses resultados mostram que em algumas situações os adjuvantes CpG (Figura 12) e a poliarginina (Figura 11) foram capazes de mudar a tendência da resposta imune humoral induzida pela proteína. Mas de uma maneira geral não foram capazes de amplificar a resposta imune humoral de forma significativa uma vez que os títulos de anticorpos foram similares entre os grupos que receberam a proteína (Figuras 11 e 12).

A avaliação da produção de anticorpos específicos serve como um parâmetro importante para avaliar a imunogenicidade das formulações vacinais, entretanto, é necessário avaliar também o perfil de citocinas induzidas (Figuras 13 e 14), bem como, a expressão de moléculas de superfície celular (Figuras 15 e 16). Em relação à resposta imune celular observou-se que aos 30 dias as células re-estimuladas com a rHsp65b responderam de forma específica e que as formulações contendo Hsp65b+Poliarginina, Hsp65b+KLK e Hsp65b+CpG produziram maiores quantidades de IFN- $\gamma$  em relação aos seus controles não estimulados (Figura 13A). A produção de IL-10 pelo grupo imunizado com Hsp65b+KLK foi significativamente maior que o seu controle (Figura 13D). O balanço entre a produção específica de citocinas como o IFN- $\gamma$  e IL-12 (consideradas Th1) e IL-4, IL-5 e IL-10 (consideradas Th2) servem como parâmetro do padrão de resposta induzida após a imunização. Assim, as formulações contendo Hsp65b+Poliarginina e Hsp65b+CpG induziram respostas específicas tendendo mais para o padrão Th1, já que induziram maior produção de IFN- $\gamma$  em comparação a formulação Hsp65b+KLK, a qual além de ter induzido uma produção moderada dessa citocina ainda induziu maior produção de IL-10 (padrão misto Th1/Th2). 90 dias após a imunização as citocinas foram produzidas em menores quantidades, e apenas Hsp65b+KLK e Hsp65b+CpG sustentaram a resposta de produção específica de IFN- $\gamma$  e IL-12, sendo que os níveis de IL-10 foram muito baixos (não mostrado). Os resultados da análise da expressão de moléculas de ativação na superfície celular mostraram que após 30 ou 90 dias da imunização parece ser mantido um mesmo percentual de células que co-expressam CD4 ou CD8 e CD44 nos linfonodos drenantes em todos os grupos estudados. Dentro dessa população celular o maior percentual de expressão de CD44<sup>high</sup> (fenótipo ativado) ocorreu somente após 90 dias da imunização nos grupos que receberam Hsp65b nas formulações

vacinais. Isso sugere que a adição de Hsp65 às formulações modulou a expressão desse marcador de ativação mudando portanto o fenótipo de células presentes nesse sítio. Entretanto, conforme também observado nos ensaios para a detecção de citocinas, após 90 dias da imunização a amplitude dessa resposta foi diminuída. Isso sugere a necessidade de sustentar a liberação do antígeno por um período maior que 30 dias para que a resposta também seja mantida por um período maior. Para alcançar esse objetivo a estratégia poderia ser uma dose de reforço de proteína e/ou adjuvante. Pensando ainda no conceito de dose única o reforço poderia ser uma formulação para liberação mais lenta da proteína encapsulada co-administrada com o antígeno encapsulado na formulação para a liberação mais rápida em um modelo de *prime-boost* homólogo de dose única.

Após o estudo da imunogenicidade o passo seguinte foi avaliar a proteção conferida pelas formulações preparadas com a proteína Hsp65a ou Hsp65b, ou seja, os animais vacinados foram infectados para avaliação da proteção contra a doença. Também avaliamos os níveis de anticorpos específicos contra a Hsp65 no soro e observamos que estes aumentaram, inclusive nos controles (Figuras 17 e 18). Isso já era esperado uma vez que o próprio bacilo produz a proteína Hsp65 e, por esse motivo, os animais controles também podem responder contra esse antígeno. Outra observação importante foi a de que a razão IgG2a/IgG1 também tendeu a 1 naqueles grupos infectados após 30 dias da imunização com as formulações contendo a proteína Hsp65a. Entretanto, nos grupos infectados aos 90 dias a razão IgG2a/IgG1 tendeu a ser maior para os grupos Hsp65a+KLK e Hsp65a+Poliarginina em relação ao grupo Hsp65a que, inclusive, apresentou uma razão menor que 1 (Figura 17B). Isso mostra que os grupos que receberam a proteína Hsp65a e o adjuvante (KLK ou Poliarginina) responderam de forma diferente ao grupo que recebeu somente a proteína Hsp65a.

Na infecção após 30 dias da imunização com as formulações contendo a proteína mais purificada Hsp65b, Hsp65b+Poliarginina ou Hsp65b+CpG observou-se que os títulos de anticorpos anti-Hsp65 da subclasse IgG1 foram maiores em relação aos títulos de IgG2a (Figura 18A). Nesse mesmo experimento observou-se que alguns animais do grupo Hsp65b+KLK não produziram níveis detectáveis de IgG1. Nos grupos infectados após 90 dias da imunização a formulação contendo Hsp65b+CpG ou Hsp65b+KLK induziram mais IgG2a que IgG1. Os outros grupos mantiveram o padrão de resposta com prevalência da subclasse de IgG1 em relação a IgG2a (Figura 18A). A razão IgG2a/IgG1 aumentou aos 90 dias da imunização se comparado ao resultado obtido aos 30 dias (Figura 18B). É importante ressaltar que a maior parte dos animais que recebeu a formulação de Hsp65b+KLK não produziu níveis detectáveis de IgG1 e, por isso, a figura que mostrou a razão IgG2a/IgG1 aos 30 dias não mostra nenhuma barra para

esse grupo, apenas um animal produziu níveis detectáveis de IgG1 e a razão IgG2a/IgG1 para esse animal foi próxima de 2. Além disso, observou-se que a resposta desencadeada pela formulação Hsp65b+CpG só aumentou a razão IgG2a/IgG1 quando os animais foram infectados mais tardiamente (90 dias). Essa mesma tendência foi mostrada nos ensaios de imunogenicidade (Figura 12C), sugerindo que o adjuvante CpG esteja modulando a resposta para um padrão Th1 num período mais tardio após a imunização. Em conjunto, esses resultados confirmam os achados descritos na seção 4.2.2 onde mostramos que antes da infecção os animais vacinados com a formulação contendo a proteína com mais LPS (Hsp65a) respondem com uma produção mais equilibrada entre IgG2a e IgG1 após 30 dias da imunização. Já a remoção parcial do LPS (Hsp65b) fez com que aos 30 dias da imunização a produção de IgG1 específica fosse maior que IgG2a (Figuras 11 e 12).

Nos ensaios de proteção observou-se que a presença da proteína Hsp65a nas formulações reduziu a carga bacilar do pulmão comparada aos controles (Figuras 23 e 24A). Esses dados mostram que apesar de não proteger de forma significativa contra TB, o encapsulamento da proteína na microesfera pode representar uma boa estratégia para aumentar a imunogenicidade da vacina baseada na proteína com apenas uma dose do antígeno (cerca de 5µg). Isso é muito importante uma vez que resultados publicados por nosso grupo mostraram que a proteína administrada com adjuvante incompleto de Freund em três doses (dose total de 75 µg) não confere nenhuma proteção. Para a proteção efetiva, embora de curta duração, foram necessárias 4 doses (dose total de 20 µg) de proteína formulada em lipossomas (Lima *et al.*, 2001). Assim, a redução do número de doses alcançada através do encapsulamento da proteína em microesferas representa um avanço na otimização da vacina de subunidade baseada nesse antígeno. Nos ensaios de proteção assim como em outros ensaios também comparamos a eficácia protetora das formulações preparadas com a proteína Hsp65a e Hsp65b e conforme já se esperava a remoção parcial do LPS também interferiu nessa resposta.

As formulações contendo Hsp65a+Poliarginina ou Hsp65a+KLK induziram proteção significativa e duradoura (90 dias) contra a infecção (Figura 23). Entretanto, a formulação contendo Hsp65a+KLK foi mais eficiente que a formulação de Hsp65a+Poliarginina em induzir proteção contra a infecção, tendo reduzido cerca de 100 vezes a carga bacilar se comparada ao grupo controle (Figura 23B). A eficácia protetora também foi afetada após a remoção de parte do LPS da proteína utilizada nas formulações vacinais. A formulação de Hsp65a+Poliarginina que antes promovia certa proteção (Figura 23A) passou a não proteger mais (Figura 24) e, também, a formulação de Hsp65a+KLK que antes conferia proteção após 90 dias da vacinação (Figura 23B) passou a proteger por um período menor, 30 dias (Figura 24). Esses resultados ressaltam

um possível efeito sinérgico do LPS com alguns dos adjuvantes utilizados e sugerem que o adjuvante desempenha um papel essencial na duração da resposta imune protetora desencadeada contra um determinado antígeno.

Os ensaios de proteção, analisados pela contagem no número de bacilos recuperados no pulmão fornecem dados muito importantes para escolha dos melhores candidatos a vacinas contra TB. Entretanto, tem se tornado cada vez mais necessária a análise histológica do pulmão dos animais infectados após a vacinação. Isso porque o limite entre a resposta protetora contra TB e o dano tecidual causado por essa resposta é muito tênue, ou seja, a redução da carga bacilar nem sempre vai estar diretamente relacionada à preservação do parênquima pulmonar. Nossos resultados mostraram que 30 dias após a imunização a formulação contendo Hsp65a+KLK induziu uma resposta imune capaz de reduzir a área de pulmão comprometida pela infecção. Assim, ao mesmo tempo em que reduziu a carga bacilar promoveu a manutenção da estrutura do parênquima pulmonar (Figuras 25 e 26). Por outro lado, a formulação contendo Hsp65a+Poliarginina que também promoveu uma redução na carga bacilar (Figura 23A) e, apesar de não ter causado um dano tecidual extenso, induziu uma resposta mais agressiva para o pulmão. Esse resultado confirmou portanto, que a formulação contendo Hsp65a+KLK é a candidata a vacina contra TB mais promissora em nosso estudo.

Esses foram resultados bastante promissores, e no ensaio seguinte avaliou-se a proteção conferida por formulações preparadas com a proteína mais purificada (Hsp65b). Os resultados dessa etapa foram importantes porque confirmaram os resultados esperados a partir da observação de que a remoção mesmo parcial do LPS das formulações vacinais promovia algumas mudanças em termos do padrão de resposta protetora. Assim, utilizando a proteína com menor contaminação por LPS observou-se que animais infectados após 30 dias da imunização com Hsp65b+KLK também apresentaram o menor grau de comprometimento do parênquima pulmonar 5-15% (Figuras 27 e 28). Esse resultado corrobora com os dados da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) no pulmão, a qual também foi significativamente menor se comparada aos outros grupos. Por outro lado, os animais infectados 90 dias após a imunização apresentaram um comprometimento do parênquima pulmonar menor, principalmente nos grupos que receberam Hsp65b na formulação. Entretanto, conforme mostrado pela contagem de UFC, nenhum desses grupos foi capaz de reduzir de forma significativa a carga bacilar (Figura 24B). Assim, nessa etapa do trabalho observou se que a formulação Hsp65b+KLK continuou sendo a melhor candidata a vacina contra TB e deverá ser melhor estudada.

Todos esses resultados de diminuição da eficácia protetora vêm acompanhados de uma diminuição da amplitude das respostas imunes celulares específicas quando da remoção parcial

do LPS da proteína recombinante. Esses resultados refletem exatamente o que se observa nas respostas imunes desencadeadas por formulações contendo a proteína Hsp65a com mais ou menos LPS (Hsp65a-LPS<sup>alto</sup> e Hsp65a-LPS<sup>baixo</sup>), ou seja, a remoção desse imunostimulante interfere diretamente no tipo da resposta imune desencadeada e, conseqüentemente, na proteção. Entretanto, é importante ressaltar que a remoção do LPS é necessária e desejada. Nesse sentido, os resultados aqui encontrados ressaltam que é possível formular uma vacina protetora contra TB baseada na proteína recombinante e que, para que esta resposta confira proteção de longa duração poderia se avaliar a associação de mais de um adjuvante imunostimulante à formulação vacinal e/ou o uso de um sistema que sustente a liberação do antígeno por um período de tempo maior.

Em relação à formulação contendo Hsp65+Poliarginina a expectativa era a de que houvesse alguma proteção contra a infecção. Isso porque dados da literatura mostraram que a poliarginina quando utilizada como adjuvante em vacinas de peptídeos tumorais induz proteção contra o desafio com células tumorais viáveis em modelo animal (SCHMIDT *et al*, 1997). Em 2002, Mattner e colaboradores mostrou que uma vacina contendo a poliarginina e peptídeos tumorais induziu aumento no número de células apresentadoras de antígeno no local da injeção, bem como, da captura do antígeno por essas células. Além disso, essa formulação vacinal também foi muito eficiente em induzir resposta imune específica de células T CD8 contra esses antígenos tumorais (MATTER *et al*, 2002). Apesar de ter protegido animais nos experimentos com a formulação preparada com a proteína com maior quantidade de LPS, ela não foi eficiente após a remoção de parte do LPS da proteína utilizada na formulação. Isso não impede que essa formulação seja redesenhada para uma nova tentativa de utilizar a poliarginina como adjuvante para a vacina com Hsp65. Entretanto, fica claro que é necessário adicionar mais adjuvante a essa formulação, seja ele a poliarginina ou um outro adjuvante, talvez um derivado do LPS já que parece haver algum sinergismo entre eles.

O mecanismo pelo qual o adjuvante KLK estaria atuando no nosso modelo de estudo não foi esclarecido ainda. O KLK é um peptídeo antimicrobiano catiônico (CAMP) sintético derivado de proteínas antimicrobianas da hemolinfa de inseto (*Sarcophaga peregrina*). Em 1994 Natori publicou um trabalho em que descreveu o isolamento de três proteínas antimicrobianas da hemolinfa de larvas de *S. pererina* imunizadas e, além disso, sintetizou o KLK a partir de uma sequência de 11 peptídeos identificados em uma das proteínas (sapecina B). Esse peptídeo apresentou atividade antimicrobiana *in vitro* contra várias bactérias incluindo a cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) (ALVAREZ-BRAVO *et al*, 1994) e também *in vivo* (ALVAREZ-BRAVO *et al*, 1995). Essa atividade quimioterapêutica foi

relacionada com a capacidade desse peptídeo em induzir a produção de superóxido por neutrófilos (NAKAJIMA *et al.*, 1997). Além disso, tem sido descrito que certos CAMPs são capazes de recrutar diferentes subclasses de células do sistema imune (YANG *et al.*, 2002). Nesse sentido, observamos em nossos experimentos que as formulações contendo o KLK sozinho ou com a proteína Hsp65b não promoveram o recrutamento preferencial de nenhuma das células estudadas (mononucleares, neutrófilos ou eosinófilos), Figura 32. Entretanto, observou-se que a presença de Hsp65b nas formulações vacinais favoreceu a migração de neutrófilos para o local da administração (Figura 32D). Essa propriedade pode estar relacionada à Hsp65 ou mesmo a quantidade de LPS presente na Hsp65b, entretanto, o fato do KLK estar relacionado à ativação de neutrófilos e monócitos sugere que esse imunomodulador possa estar ativando essas células no microambiente da administração da vacina e, talvez isso tenha alguma implicação na atividade protetora induzida pela formulação que contém Hsp65b+KLK. Além disso, descreveu-se recentemente que CAMPs como a defensinas- $\alpha$  produzidas por neutrofilos humanos aumentam a produção de anticorpos específicos (IgG) no soro e a liberação de IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-6 e IL-10 por células T CD4 (LILLARD *et al.*, 1999; TANI *et al.*, 2000). É necessário ressaltar ainda, que os neutrófilos têm importante papel na maturação de células dendríticas e, de forma indireta, na apresentação de antígenos para as células do sistema imune durante a infecção microbiana (BENNOUNA *et al.*, 2003). Nesse caso, talvez a presença do KLK na formulação mais protetora possa estar facilitando a captura do antígeno, a maturação de células apresentadoras e, conseqüentemente, a apresentação do antígeno para as células do sistema imune.

A resposta observada para a formulação contendo Hsp65b+CpG não correspondeu às expectativas iniciais, uma vez que essa formulação induziu uma resposta imune tendendo ao padrão Th1 porém não foi protetora. Além das citocinas e do perfil de anticorpos aqui mostrados, através de uma colaboração com outro grupo de pesquisadores, pudemos constatar que o co-encapsulamento de antígenos com o CpG 1668 também é capaz de ativar células T CD8. Isso contribui mais ainda para a nossa surpresa já que, aparentemente, a vacinação com essa formulação reúne a maior parte dos requisitos envolvidos na proteção contra a tuberculose experimental.

De qualquer forma nossos resultados foram bastante interessantes porque aparentemente as formulações que induziram respostas de padrão Th1, onde se observou maior produção de IFN- $\gamma$  (Hsp65b+Poliarginina e Hsp65b+CpG) e quantidades menores de IL-10 não foram as que mais protegeram. A formulação mais protetora (Hsp65b+KLK) desencadeou uma resposta de padrão misto Th1/Th2 onde se observou produção moderada de IFN- $\gamma$  e níveis

significativamente maiores de IL-10. Corroborando com o fato desse adjuvante não ter se mostrado um bom indutor de uma resposta Th1, em 2004 um outro grupo relatou que o KLK co-administrado com antígenos (OVA e vacina viral contra influenza) induziu respostas do tipo Th2, tendo sido atribuído a ele propriedades adjuvantes como o aumento da captura do antígeno pela célula apresentadora e a formação de depósito (FRITZ *et al*, 2004). Então como explicar que uma vacina que não está induzindo uma resposta predominantemente Th1 possa estar conferindo proteção contra uma infecção como a tuberculose?

Recentemente também tem se discutido sobre o tipo de resposta que devem ser levadas em conta para o desenho de vacinas contra TB. A proteção contra a tuberculose esta relacionada à indução de respostas de padrão Th1 e, muitos são os trabalhos que tem demonstrado isso (Revisto por KIDD, 2003; LIENHARDT *et al*, 2002; LOWRIE *et al*, 1999; Revisado por SALGAME, 2005; Revisto por SILVA *et al*, 2000). Entretanto, as respostas protetoras do ponto de vista da capacidade de reduzir a carga bacilar também devem assegurar a preservação e/ou a recuperação do órgão infectado. Mais recentemente, tem se discutido uma nova situação para ser considerada durante o desenho de vacinas contra TB, que é a necessidade de se regular as respostas Th2 pré-existentes (ROOK *et al*, 2005). Isso porque citocinas como a IL-4 parecem estar envolvidas com a imunopatologia e fibrose mediada por TNF- $\alpha$  numa situação onde a resposta Th1 foi induzida. Assim uma vacina que induza células regulatórias poderia minimizar o efeito acima descrito. O assunto que envolve a regulação das respostas imunes é bastante complexo e nossos achados de indução de IL-10, em níveis significativos, nos animais que receberam a formulação mais protetora devem ser melhor investigados. Num primeiro momento esses achados parecem contraditórios já que as respostas Th1 são essenciais para o controle da doença. Entretanto, não se pode descartar que células produtoras dessa citocina possam estar auxiliando no controle adequado da resposta protetora, favorecendo a recuperação do parênquima pulmonar enquanto a carga bacilar é reduzida. Diante disso, é essencial um estudo detalhado dos mecanismos desencadeados pela formulação mais promissora e isso inclui o estudo pormenorizado do fenótipo das células presentes no local da infecção.

Pode se concluir desse trabalho, que é possível formular uma vacina para a administração em dose única baseada na proteína recombinante Hsp65. A formulação contendo Hsp65+KLK foi capaz de induzir uma resposta protetora contra TB, tendo promovido a redução da carga bacilar sem causar dano tecidual significativo no pulmão. A remoção parcial de LPS da proteína utilizada nas formulações que conferiram proteção promoveu uma diminuição na duração da proteção, sugerindo que o adjuvante seja importante para a manutenção da resposta. Além disso, os mecanismos imunológicos envolvidos na

resposta protetora parecem estar relacionados a uma resposta de padrão misto Th1/Th2 e os eventos iniciais da resposta desencadeada devem estar relacionados a capacidade de microesferas contendo Hsp65+KLK interagir e ativar macrófagos e neutrófilos recrutados após a sua administração. Assim, como perspectivas futuras, além do estudo mais detalhado sobre os mecanismos envolvidos na proteção, pretende-se otimizar a vacina Hsp65+KLK visando aumentar a duração da resposta induzida por ela. Para isso pretende-se utilizar como estratégia a administração de uma dose de reforço com a proteína e adjuvante, utilizando o conceito de “prime-boost” homólogo de dose única, por meio da combinação de microesferas que liberem o antígeno em diferentes intervalos de tempo durante um período maior.

## **6. RESUMO**

A tuberculose (TB) é uma das doenças infecciosas que mais matam em todo o mundo e apesar da introdução da vacina BCG e de drogas, a disseminação da TB ainda não foi controlada. Assim, a otimização da vacina BCG e/ou o desenvolvimento de novas vacinas profiláticas e terapêuticas é essencial para o combate a essa doença. Dentre as potenciais vacinas recentemente priorizadas pela Organização Mundial da Saúde para iniciar os ensaios clínicos em humanos nos próximos anos, encontra-se a baseada no antígeno Hsp65, desenvolvida por nosso grupo (ENSERINK, 2001). Embora a vacina de DNA codificando a proteína Hsp65 tenha sido a melhor dentre as formulações avaliadas, ainda é necessário otimizá-la visando o aumento da imunogenicidade e eficácia protetora contra TB. Nesse contexto avaliar o uso das vacinas de subunidade baseadas em antígenos recombinantes também é pertinente porque essas vacinas são seguras, de fácil formulação, administração e produção. Assim, com o intuito de formular uma vacina de subunidade de dose única propôs-se o uso de microesferas biodegradáveis (PLGA) e imunostimulantes (Poliarginina, KLK ou CpG) para formular novas vacinas baseadas na proteína Hsp65 recombinante. Uma dose única dessas formulações vacinais foi administrada a camundongos isogênicos (*i.m.*) para análise da resposta imune (humoral e celular) induzida e também para avaliação da eficácia protetora contra a infecção experimental por *M. tuberculosis* H37Rv. Nossos resultados mostraram que as formulações contendo a proteína ou a proteína e os adjuvantes foram capazes de induzir respostas imunes específicas. As formulações Hsp65+Poliarginina e Hsp65+CpG induziram uma resposta de padrão Th1 enquanto a vacina contendo Hsp65+KLK induziu uma resposta mista Th1/Th2. Apesar de ter estimulado esse padrão de resposta a formulação contendo Hsp65+KLK reduziu em 100 vezes a carga bacilar em relação ao grupo controle, bem como, preservou a estrutura do parênquima pulmonar. Além disso a utilização de uma proteína com maior quantidade de LPS na formulação que também contém KLK induziu uma proteção de maior duração, sugerindo que o adjuvante LPS também desempenha importante papel na resposta induzida. Pode se concluir desse trabalho, que é possível formular uma vacina para a administração em dose única baseada na proteína recombinante Hsp65. Assim, como perspectivas futuras, além do estudo mais detalhado sobre os mecanismos envolvidos na proteção, pretende-se otimizar a vacina Hsp65+KLK visando aumentar a duração da resposta induzida por ela. Para isso pretende-se utilizar como estratégia a administração de uma dose de reforço com a proteína e adjuvante, utilizando o conceito de “prime-boost” homólogo de dose por meio da combinação de microesferas que liberem o antígeno em diferentes intervalos de tempo durante um período maior.

## **7.ABSTRACT**

Tuberculosis infection (TB) still remains a leading cause of death worldwide, although the BCG vaccine has been used for 80 years. There is an urgent need to develop improved BCG or new tuberculosis vaccines for the prevention and/or cure of TB. Recently the WHO indicates the vaccine in development by our group, based on the heat shock protein from *Mycobacterium leprae* (Hsp65), as one among other good candidates to start human clinical trials in coming years. Until now, the DNA-Hsp65 vaccine was the best formulation that we have evaluated for protection and therapy against experimental tuberculosis. However, for its application in human clinical trials, the formulation still needs to be further optimized. In parallel to the optimization of the DNA-Hsp65 vaccine we are developing a subunit vaccine based on the recombinant protein (rHsp65). Therefore, in this work was evaluated the efficacy of a single dose subunit vaccine based on Hsp65 protein, associated or not with immunostimulants, and entrapped into biodegradable PLGA microspheres against infection with *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Our results showed that the protein was efficiently entrapped into microspheres and particles presented diameter adequate to be engulfed by phagocytes. Mice vaccinated by a single dose of rHsp65-microspheres developed both humoral and cellular specific immune responses; however they were not protected against challenge infection with *M. tuberculosis*. As an alternative strategy, we developed other microsphere formulations based on rHsp65 associated with immunostimulants, KLK, Poly-L-arginine or CpG 1668. The formulations based on rHsp65+poly-L-arginine or rHsp65+CpG 1668 were not protective against challenge with *M. tuberculosis*, although they induced Th1 type specific immune response, that is related to the protective response in TB model. The rHsp65+KLK – loaded microspheres that induced a mixture of Th1/Th2 type response allowed a significative reduction in CFU number and also minimal lung parenchyma damage. These data suggest that subunit vaccine based on the recombinant protein Hsp65 seems to be feasible since rHsp65+KLK-loaded microspheres was protective, however it was not a long-lasting response. Microspheres containing rHsp65 with high levels of LPS contamination and KLK induced a protective and long-lasting response, standing out the important role of the adjuvant component of a vaccine formulation. The perspective of this work is to further characterize the immune response elicited by each formulation as well as to evaluate new formulations and other immunization strategies like prime-boost aiming to elicit a protective and long-lasting immune response.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ADAMS, D.O.; HAMILTON, T.A. Molecular basis of macrophage activation: diversity and its origins. In: LEWIS & MCGEE (Eds.) **The macrophage**. Oxford University Press, p.75-114, 1992.
- AGGARWAL, M.K. In: AGGARWAL, M.K. editor. Bacterial endotoxins and host response. Amsterdam: Elsevier, p.10-21, 1980.
- AIDA, Y.; PABST, M.J. J. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. **Immunol. Methods**, p.132:191, 1990.
- ALGOOD, H.M.S.; CHAN, J.; FLYNN, J.L. Chemokines and tuberculosis. **Cytokine & Growth Factor Reviews** v.14, p.467-77, 2003.
- ALGOOD, H.M.S.; FLYNN, J.L. CCR5-deficient mice control *Mycobacterium tuberculosis* infection despite increased pulmonary lymphocytic infiltration. **J. Immunol.** v.173, p.3287-96, 2004.
- ALTARE, F.; LAMMAS, D.; REVY, P. *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.
- ALVAREZ-BRAVO, J.; KURATA, S.; NATORI, S. Mode of action of an antibacterial peptide KLKLLLLLKLK-NH<sub>2</sub>. **J. Biochem (Tokyo)**. v.117, n.6, p.1312-6, 1995.
- ALVAREZ-BRAVO, J.; KURATA, S.; NATORI, S. Novel synthetic antimicrobial peptides effective against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Biochem (Tokyo)**, v.302, p.535-8, 1994.
- ANDERSEN, P. TB vaccines: progress and problems. **Trends Immunol.**,v.22, n.3, p.160-8, 2001.
- ARMSTRONG, J.A.; HART, P.D. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. **J. Exp. Med.**, v.142, p.1-16, 1975.
- BABIUK, L.A.; BABIUK, S.L.; LOEHR, B.I. *et al.* Nucleic acid vaccines: research tool or commercial reality. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.76, p.1-23, 2000.
- BABIUK, L.A.; PONTAROLLO, R.; BABIUK, S. *et al.* Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals. **Vaccine**, v.21, p.649-658, 2003.
- BALDWIN, S.L.; D'SOUZA, C.D.; ORME, I.A. *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of DNA vaccines encoding secreted and non-secreted forms of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85A. **Tubercle and Lung Disease** , v.79, n.4, p.251-259, 1999.
- BARNES, P.F.; GRISSO, C.L.; ABRAMS, J.S. *et al.*  $\gamma\delta$  T lymphocytes in human tuberculosis. **J. Infect. Dis.**, v.165, p.506-12, 1992.
- BAUSINGER, H.; LIPSKER, D.; ZIYLAN, U. *et al.* Endotoxin-free heat-shock protein 70 fails to induce APC activation. **Eur. J. Immunol.** v.32, p. 3708-13, 2002.
- BAZILE, D.V.; ROPERT, C.; HUVE, P. *et al.* Bodydistribution of fully biodegradable <sup>14</sup>C-poly (lactic acid) nanoparticles coated with albumin after parenteral administration to rats. **Biomaterials**, v.13, p.1039-1102, 1992.
- BEAN, A.G.D.; ROACH, D.R.; BRISCOE, H. *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.
- BELANICH, M; CUMMINGS, B.; GROB, D.*et al.* **Pharm. Tech.** v.20, n.3, p.142, 1996.

- BENNOUNA, S.; BLISS, S.K.; CURIEL, T.J. *et al.* Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. **J. Immunol.** v.171, n.11, p.6052-8, 2003.
- BERMUDEZ, L.E. Production of transforming growth factor- $\beta$  by *Mycobacterium avium*-infected human macrophages is associated with unresponsiveness to IFN- $\gamma$ . **J. Immunol.** v.150, p.1838-45, 1993.
- BERMUDEZ, L.E.; YOUNG, L.S. Natural killer cell-dependent mycobacteriostatic and mycobactericidal activity in human macrophages. **J. Immunol.** v.146, p.265-70, 1991.
- BHATT, K.; HICKMAN, S.P.; SALGAME, P. Cutting edge: a new approach to modeling early lung immunity in murine tuberculosis. **J. Immunol.** v.172, p.2748-51, 2004.
- BIRD, A.P. CpG-rich islands and function of DNA methylation. **Nature**, v.321, p.209-13, 1986.
- BLOOM, B.R.; MURRAY, J.L. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. **Science**, v.257, p.1055-1064, 1992.
- BOMAN, H.G. Innate immunity and the normal microflora. **Immunol. Rev.** v.173, p.5-16, 2000.
- BONATO, V.L.D.; LIMA, V.M.F.; TASCONE, R.E. *et al.* Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis* infected mice. **Infect. Immun.** v.66, p.169-175, 1998.
- BONECINI-ALMEIDA, M.G.; CHITAL, S.; BIUTSIKAKIS, I. *et al.* Introduction of in vitro human macrophage anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity: requirement for IFN- $\gamma$  and primed lymphocytes. **J. Immunol.** v.160, p.4490-9, 1998.
- BOOM, W.H. Gamma delta T cells and *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbes. Infect.** v.1, p.187-195, 1999.
- BRANDT, L.; SKEIKY, Y.A.; ALDERSON, M.R. *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.6622-6632, 2004.
- BREWER, J.M.; M. CONACHER, C.A. HUNTER, M. *et al.* Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. **J. Immunol.** v.163, n.12, p.6448-6454, 1999.
- BRUDNEY, K.; DOBKIN, J. Resurgent tuberculosis in New York City. Human immunodeficiency virus, homelessness, and the decline of tuberculosis control programs. **Am. Rev. Resp. Dis.** v.144, n.4, p.745-749, 1991.
- BUSCHLE, M.; SCHMIDT, W.; ZAUNER, W. *et al.* Transloading of tumour antigen-derived peptides into antigen-presenting cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.94, p.3256-61, 1997.
- CENTOCOR, US Patent, U 03773, 1988.
- CHACE, J.H.; HOOKER, N.A.; MILDEINSTEIN, K.L. *et al.* Bacterial DNA-induced NK cell IFN $\gamma$  production dependent on macrophage secretion of IL 12. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v.84, p.185-93, 1997.
- CHAN, J.; FAN, X.; HUNTER, S.W. *et al.* Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. **Infect. Immun.**, v.59, p.1755-61, 1991.
- CHAN, J.; TANAKA, K.; CARROLL, D. *et al.* Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, v.63, p.736-40, 1995.
- CHAN, J.; FLYNN, J.L. Nitric oxide in *Mycobacterium tuberculosis* infection. In: FANG, F.C. editor. Nitric oxide and infection. New York: Kluwer Academic Plenum. P.281-310, 1999.

- CHO, J.H.; HOMMA, K.; KANEGASAKI, S.; NATORI, S. Activation of human neutrophils by a synthetic antimicrobial peptide, KLKLLLLLKLK-NH<sub>2</sub>, via cell surface calreticulin. **Eur. J. Biochem.**, v.266, n.3, p.878-85, 1999.
- 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, 949p, 1995.
- CLEMENS, D.L.; HORWITZ, M.A. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. **J. Exp. Med.**, v.181, p.257-70, 1995.
- COLE, S.T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J. *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from complete genome sequence. **Nature**, v.393, p.537-544, 1998.
- COLE, A.M.; GANZ, T.; LIESE, A.M. *et al.* Cutting edge: IFN-inducible ELR- CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity. **J. Immunol.** v.167, n.2, p.623-7, 2001.
- CONDOS, R.; ROM, W.N.; LIU, Y.; SCHLUGER, N.W. Local immune responses correlate with presentation and outcome in tuberculosis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** v.157, p.729-35, 1997.
- COOPER, A.M.; DALTON, D.K.; STEWART, T.A. *et al.* Disseminated tuberculosis in interferon  $\gamma$  gene-disrupted mice. **J. Exp. Med.**, v.178, p.2243-47, 1993.
- COUVREUR, P.; PUISIEUX, F. Nano- and microparticles for the delivery of peptides and proteins. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.10, p.141-162, 1993.
- COVERT, B.A.; SPENCER, J.S.; ORME, I.M., BELISLE, J.T. The application of proteomics in defining the T cell antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. **Proteomics** v.1, n.4, p.574-86, 2001.
- COX, J.; COULTER, A. Advances in adjuvant technology and application. In: Animal parasite control utilizing Biotechnology (W. K. Yong, Ed.), p.51-112. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1992.
- D' ANDREA, A.; RENGARAJU, M.; VALIANTE, N.M. *et al.* Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. **J. Exp. Med.**, v.176, p.1387-98, 1992.
- DANNENBERG, A.M. Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. **Rev. Infect. Dis.**, v.11, p.369-378, 1989.
- DENIS, M. Killing of *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes activation by cytokines and calcitriol. **Clin. Exp. Immunol.** v.84, p.200-6, 1991.
- DESTOUMIEUX-GARZON, D.; SAULNIER, D.; GARNIER, J. *et al.* Crustacean immunity: antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. **J. Biol. Chem.** v.276, n.50, p.47070-7, 2001.
- DIELI, F.; TROYE-BLOMBERG, M.; IVANYI, J. *et al.* Granulysin-dependant killing of intracellular and extracellular *Mycobacterium tuberculosis* by V gamma 9/V delta 2 T lymphocytes. **J. Infect. Dis.** v.184, p. 1982- 1985, 2001.
- DING, A.H.; NATHAN, C.; STUEHR, D. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. **J. Immunol.** v.141, p.2407-12, 1988.
- DING, J.L.; ZHU, Y.; BOW, H. High-performance affinity capture-removal of bacterial pyrogen from solution. **J. Chromatogr. B**, v.759, p.237-46, 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.

- DONNELLY, J.J., WAHREN B, LIU MA. DNA vaccines: progress and challenges. **J. Immunol.** v.175, n.2, p.633-9, 2005.
- DYE, C.; SCHEELE, S.; DOLIN, P. *et al.* Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. **JAMA** v.282, n.7, p.677-86, 1999.
- ELDRIDGE, J. H.; STAAS, J. K.; MEULBROEK, J. A. *et al.* Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. **Molec. Immun.** v.28, p.287-294, 1991.
- ESIN, S.; BATONI, G.; KALLENIOUS, G. *et al.* Proliferation of distinct human T cell subsets in response to live, killed or soluble extracts of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **Clin. Exp. Immunol.** v.104, p.419-25, 1996.
- ENSERINK, M. Driving a stake in resurgent TB. **Science** v.293, n.5528, p.234-5, 2001.
- FACCIOLI, L.H.; NOURSHARGH, S.; MOQBEL, R. *et al.* The accumulation of <sup>111</sup>In-eosinophils induced by inflammatory mediators, *in vivo*. **Immunology** v.73, n.2, p.222-7, 1991.
- FACCIOLI, L.H.; SOUZA, G.E.; CUNHA, F.Q. *et al.* Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. **Agents Actions.** v.30, n.3-4, p.344-9, 1990.
- FARBAIRN, I.P. Macrophage apoptosis in host immunity to mycobacterial infections. **Biochemical Society Transactions** v.32, p.3, 2004.
- FENTON, M.J.; VERMEULEN, M.W.; KIM, S. *et al.* Induction of  $\gamma$  interferon production in human alveolar macrophages by *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.** v.65, p.5149-56, 1997
- FINE, P.E.M.; CARNEIRO, I.A.M.; MILTIENS, J.B. *et al.* Issues relating to the use of BCG immunization programmes. **WHO Global Surveillance and Monitoring Project**, 1999.
- FLEISCHMANN, J.; GOLDE, D.W.; WEISBART, R.H.; GASSON, J.C. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor enhances phagocytosis of bacteria by human neutrophils. **Blood** v.68, p.708-11, 1986.
- FLYNN, J.L.; CHAN, J.; TRIEBOLD, K.J. *et al.* An essential role for interferon  $\gamma$  in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J. Exp. Med.** v.178, p.2249-54, 1993.
- FLYNN, J.L.; GOLDSTEIN, M.M.; CHAN, J. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha 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, 2001a.
- FLYNN, J.L.; CHAN, J. Tuberculosis: latency and reactivation. **Infect. Immun.**, v.69, p.4195-201, 2001b.
- FRITZ, J.H.; BRUNNER, S.; BIRNSTIEL, M.L. *et al.* The artificial antimicrobial peptide KLKLLLLLKLK induces predominantly a TH2-type immune response to co-injected antigens. **Vaccine**, v.22, p.3274-3284, 2004.
- FUTAKI, S.; OHASHI, W.; SUZUKI, T. *et al.* Stearylated arginine-rich peptides: a new class of transfection systems. **Bioconjug. Chem.** Nov-Dec;12(6):1005-11, 2001.
- GARNES, M.S.; FLORIDO, M.; PAIS, T.F. *et al.* Improved clearance of *Mycobacterium avium* upon disruption of the inducible nitric oxide synthase gene. **J. Immunol.** v.162, p.6734-9, 1999.
- GARNETT, M.C. Gene-delivery systems using cationic polymers. **Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.** v.16, p.147-207, 1999.
- GLAUSER, MP,ZANETTI G,BAUMGARTNE R JP,COHEN J. Septic shock: pathogenesis. **Lancet** v.338, p.732-6, 1991.

- GONÇALVES, E.D.C. *et al.* Comparison of the immune response induced by intranasal or intramuscular immunization with phospholipae C from *Mycobacterium tuberculosis*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** V.34, supp.II, p.275, 2001.
- GONZALEZ-JURRERO, M; ORME, I.M. Characterization of murine lung dendritic cell infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.** v.69, p.1127-33, 2001.
- GORDON, A.H.; HART, P.D.; YOUNG, M.R. Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. **Nature**, v.286, p.79-80, 1980.
- GRANGE, J.M.; DABORN, C.; COSIVI, O. HIV-related tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*. **Eur. Respir. J.**, v.7, n.9, p.1564-6, 1994.
- GUDMUNDSSON, G.H.; AGERBERTH, B. Neutrophil antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system. **J. Immunol. Methods.** v.232, n.1-2, p.45-54, 1999.
- GULERIA, I; TEITELBAUM, R.; MCADAM, R.A. *et al.* Auxotrophic vaccines for tuberculosis. **Nat. Med.** v.2, p.334-7, 1996.
- GURUNATHAN, S.; KLINMAN, D.M.; SEDER, R.A. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. **Annu Rev Immunol.** v.18, p.927-74, 2000.
- HALPERN, M.D.; KURLANDER, R.J.; PISETSKY, D.S. Bacterial DNA induces interferon gamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor- $\alpha$ . **Cell. Immunol.** v.167 p.983-97, 1996.
- HANCOCK, R.E. Host defence (cationic) peptides: what is their future clinical potential? **Drugs** v.57, n.4, p.469-73, 1999.
- HANCOCK, R.E.; DIAMOND, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. **Trends Microbiol.** v.8, n.9, p.402-10, 2000.
- HARTMANN, G.; WEERATNA, R.D.; BALLAS, Z.K. *et al.* Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. **J. Immunol.** v.164, n.3, p.1617-24, 2000.
- HASHIMOTO, T. BCG vaccines for the prevention of tuberculosis in the world. **Kekkaku** v.72, n.11, p.629-37, 1997.
- HEMMI, H.; TAKEUCHI, O.; KAWAI, T. *et al.* Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature** v.408, n.6813, p.740-5, 2000. Erratum in: **Nature** v. 408, n.6813, p.740-5, 2000.
- HESS, J.; MIKO, D.; CATIC, A. *et al.* *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette- Guerin strains secreting listeriolysin of *Listeria monocytogenes*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A** v.95, p.5299-5304, 1998.
- HIRAYAMA, C.; SAKATA, M.; NAKAMU, R.A.M. *et al.* Preparation of poly (e-lysine) adsorbents and application to selective removal of lipopolysaccharides. **J. Chromatogr. B** v.721, p.87-95, 1999.
- HIRSCH, C.S.; ELLNER, J.J.; RUSSEL, D.G. *et al.* Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages. **J. Immunol.**, v.152, p.746-53, 1994.
- HORWITZ, M. Recombinant BCG expressing *Mycobacterium tuberculosis* major extracellular proteins. **Microbes and Infection** v.7, p.947-954, 2005.
- HOU, K. C.; ZANIEWSKI, R. Endotoxin removal by anion-exchange polymeric matrix. **Biotechnol. Bioeng.** v.12, p.315-38, 1990.
- HUYGEN, K.; CONTENT, J.; DENIS, O. *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. **Nat. Med.** v.2, n.8, p.893-8, 1996.

- HWANG, S.J.; DAVIS, M.E. Cationic polymers for gene delivery: designs for overcoming barriers to systemic administration. **Curr. Opin. Mol. Ther.** v.3, p.183–91, 2001.
- ITO, M.; IKEDA, T.; KOKUBU, T. Increased proportions of peripheral blood  $\gamma\delta$  T cells in patients with pulmonary tuberculosis. **Chest** v.102, p.195-7, 1992.
- JACOB, T.; WALKER, P.S.; KRIEG, A.M. *et al.* Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligo-deoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. **J. Immunol.** v.161, p.3042-9, 1998.
- JAN, A.M. *et al.* Protection of macaques against *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. **Vaccine** v.23, p.2740–2750, 2005.
- JOUANGUY, E.; ALTARE, F.; LAMHAMEDI, S. *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.
- JOUANGUY, E.; ALTARE, F.; LAMHAMEDI-CHERRADI, S.; CASANOVA, J.L. Infections in IFNGR-1-deficient children. **J. Interferon Cytokine Res.** v.17, n.10, p.583-7, 1997.
- KANG, B.K.; SCHLESINGER, L.S. Characterization of mannose receptor-dependent phagocytosis mediated by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan. **Infect. Immun.** v.66, n.6, p.2769-77, 1998.
- KAUFMANN, S.H.; VATH, U.; THOLE, J.E. *et al.* Enumeration of T cells reactive with *Mycobacterium tuberculosis* organisms and specific for the recombinant mycobacterial 64-kDa protein. **Eur. J. Immunol.** v.17, n.3, p.351-7, 1987.
- KAUFMANN, S.H.; SCHOEL, B.; WAND-WURTTEBERGER, A. *et al.* T-cells, stress proteins, and pathogenesis of mycobacterial infections. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** v.155, p.125-41, 1990.
- KAUFMANN, S.H.E. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nature reviews** v.1, p.20-30, 2001.
- KHAN, M.Z.; OPDEBEECK, J.P.; TUCKER, I.G. Immunopotential and delivery systems for antigens for single-step immunization: recent trends and progress. **Pharm. Res.** v.11, n.1, p.2-11, 1994.
- KHON, J.; NIEMI, S.M.; ALBERT, E.C. *et al.* Single step immunization using controlled biodegradable polymer adjuvant activity. **J. Immunol. Methods.** v.95, p.31-38, 1996.
- KLINMAN, D.M.; BARNHART, K.M.; CONOVER, J. CpG motifs as immune adjuvants. **Vaccine** v.17, n.1, p.19-25, 1999.
- KOVACSOVICS-BANKOWSKI, M.; CLARK, K.; BENACERRAF, B.; ROCK, K.L. Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A** v.90, n.11, p.4942-6, 1993.
- KREMER, L.; ESTAQUIER, J.; BRANDT, E. *et al.* Mycobacterium bovis Bacillus Calmette Guerin infection prevents apoptosis of resting human monocytes. **Eur. J. Immunol.** v.27, p.2450-6, 1997.
- KRIEG, A.M.; YI, A.K.; MATSON, S. *et al.* CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. **Nature** , v.374, n.6522, p.546-9, 1995.
- KRIEG, A.M.; WAGNER, H. Causing a commotion in the blood: immunotherapy progresses from bacteria to bacterial DNA. **Immunol. Today** v.21, n.10, p.521-6, 2000.
- KRIEG, A.M. From bugs to drugs: therapeutic immunomodulation with oligodeoxynucleotides containing CpG sequences from bacterial DNA. **Antisense Nucleic Acid Drug Dev.** v.11, n.3, p.181-8, 2001.

- KRIJGSVELD, J.; ZAAT, S.A.; MEELDIJK, J. *et al.* Thrombocidins, microbicidal proteins from human blood platelets, are C-terminal deletion products of CXC chemokines. **J Biol Chem** , v.275, n.27, p.20374–81, 2000.
- LAI, C.K.; HO, S.; CHAN, C.H. *et al.* Cytokine gene expression profile of circulating CD4+ T cells in active pulmonary tuberculosis. **Chest** v.111, p.606-11, 1997.
- LAMB, F.I.; KINGSTON, A.E.; ESTRADA-G.I.; COLSTON, M.J. Heterologous expression of the 65-Kilodalton antigen of *Mycobacterium leprae* and murine T-Cell responses to the gene product. **Infect. Immun.** v.56, n.5, p. 1237-41, 1988.
- LEEM, J.Y.; JEONG, I.J.; PARK, K.T. *et al.* Isolation of p-hydroxycinnamaldehyde as an antibacterial substance from the saw fly *Acantholyda parki* S. **FEBS Lett.** v.442, n.1, p.53–6, 1999.
- LEHRER, R.I.; GANZ, T. Defensins of vertebrate animals. **Curr. Opin. Immunol.** v.14, n.1, p.96–102, 2002.
- 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.
- LI, B.; ROSSMAN, M.D.; IMIR, T. *et al.* Disease-specific changes in  $\gamma\delta$  T cell repertoire and function in patients with pulmonary tuberculosis. **J. Immunol.** v.157, p.4222-9, 1996.
- LIENHARDT, C.; AZZURRI, A.; AMEDEI, A. *et al.* Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity in vivo. **Eur. J. Immunol.** v.32, p.1605-1613, 2002.
- LILLARD JR, J.W.; BOYAKA, P.N.; CHERTOV, O. *et al.* Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophilpeptide defensins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.96, n.2, p.651–6, 1999.
- LIMA, V.M.F. O papel da hsp65 micobacteriana na atividade microbica do macrófago. Dissertação de mestrado. Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Faculdade e Medicina de Ribeirão Preto – USP, 1996.
- LIMA, K.M.; RODRIGUES JUNIOR, J.M. Poly-DL-lactide-co-glycolide microspheres as a controlled release antigen delivery system. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.32, n.2, p.171-80, 1999.
- LIMA, M.F.L.; BONATO, V.L.; LIMA, K.M. *et al.* Role of trehalose dimycolate in recruitment of cells and modulation of production of cytokines and NO in tuberculosis. **Inf. Imm.** v.60, n.9, p.5305-12, 2001a.
- LIMA, K.M.; BONATO, V.L.; FACCIOLI, L.H. *et al.* Comparison of different delivery systems of vaccination for the induction of protection against tuberculosis in mice. **Vaccine** v.19, n.25-26, p.3518-25, 2001b.
- LIMA, K.M.; DOS SANTOS, S.A.; SANTOS, R.R. *et al.* Efficacy of DNA-hsp65 vaccination for tuberculosis varies with method of DNA introduction in vivo. **Vaccine** v.22, n.1, p.49-56, 2003.
- LIMA, K.M.; DOS SANTOS, S.A.; RODRIGUES JR, J.M.; SILVA, C.L. Vaccine adjuvant: it makes the difference. **Vaccine** v.22, n.19, p.2374-9, 2004.
- LINDBLAD, E.B.; M.J. ELHAY, R.; SILVA, R. *et al.* Adjuvant modulation of immune response to tuberculosis sub-unit vaccines. **Infect. Immun.** v.65, n.2, p.623–629, 1997.
- LOWRIE, D.B.; TASCAN, R.E.; COLSTON, M.J.; SILVA, C.L. Towards a DNA vaccine against tuberculosis. **Vaccine** v.12, p.1537-1540, 1994.
- LOWRIE, D.B.; TASCAN, R.E.; SILVA, C.L. Vaccination against tuberculosis. **Int. Arch. Allergy Immunol.** v.108, n.4, p.309-12, 1995.
- LOWRIE, D.B.; SILVA, C.L.; COLSTON, M.J. *et al.* Protection against tuberculosis by plasmid DNA. **Vaccine** v.5, p. 834-838, 1997.

- LOWRIE, D.B.; SILVA, C.L.; TASCAN, R.E. DNA vaccines against tuberculosis. **Immunol. Cell Biology.** v.75, p.591-4, 1997
- LOWRIE, D.B.; TASCAN, R.E.; BONATO, V.L.D. *et al.* Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. **Nature** v.400, p.269-271, 1999.
- MAJEED, M.; PERSKVIST, N.; ERNST, J.D. *et al.* Roles of calcium and annexins in phagocytosis and elimination of an attenuated strain of *Mycobacterium tuberculosis* in human neutrophils. **Microb. Pathog.** v.24, p.309-20, 1998.
- MARTIN, C. The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG? **Eur. Respir. J.** v.26, p.162-167, 2005.
- MATTNER, F.; FLEITMANN, J.K.; LINGNAU, K. *et al.* Vaccination with poly-l-arginine as immunostimulant for peptide vaccines: induction of potent and long-lasting T cell responses against cancer antigens. **Cancer Res.** v.62, p.1477-86, 2002.
- McCLUSKIE, M.J.; WEERATNA, R.D.; DAVIS, H.L. The potential of oligodeoxynucleotides as mucosal and parenteral adjuvants. **Vaccine** v.19, n.17-19, p.2657-60, 2001.
- McSHANE, H; BROOKES, R.; GILBERT, S.C.; HILL, A.V. 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.681-6, 2001.
- McSHANE, H; GOONETILLEKE, H.P. *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.1602-1609, 2003.
- 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.1240-1244, 2004.
- MESSINA, J.P.; GILKESON, G.S.; PISETSKY, D.S. Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. **J. Immunol.** v.147, n.6, p.1759-64, 1991.
- MOLLOY, A.; MEYN, P.A.; SMITH, K.D.; KAPLAN, G. Recognition and destruction of bacillus Calmette-Guerin-infected human monocytes. **J. Exp. Med.** v.177, p.1691-8, 1993.
- MOREIN, B.; SUNDQUIST, B.; HÖGLUND, S. *et al.* Iscom, a novel structure for antigen presentation of membrane proteins from enveloped viruses. **Nature**, v.308, p.547-60, 1984.
- MOREIN, B.; VILLACRES-ERIKSSON, M.; SJOLANDER, A. *et al.* Novel adjuvants and vaccine delivery systems. **Vet Immunol Immunopathol.**, v.54, n.1-4, p.373-84, 1996.
- MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.J.; KOBAYASH, G.S. *et al.* Mycobacterium. In *Microbiologia Médica*. 3.ed. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan, cap.40, p.266-75, 2000.
- MUSTAFA, A.S.; LUNDIN, K.E.; OFTUNG, F. Human T cells recognize mycobacterial heat shock proteins in the context of multiple HLA-DR molecules: studies with healthy subjects vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium leprae*. **Infect Immun.** v.61, n.12, p.5294-301, 1993.
- NAKAJIMA, Y.; ALVAREZ-BRAVO, J.; CHO, J. *et al.* Chemotherapeutic activity of synthetic antimicrobial peptides: correlation between chemotherapeutic activity and neutrophil-activating activity. **FEBS Lett.** v.415, n.1, p.64-6, 1997.

- NATORI, S. Antimicrobial proteins of insect and their clinical application. **Nippon Rinsho** v.53, n.5, p. 1297-304, 1995.
- NAU, G.J.; GUILFOILE, P.; CHUPP, G.L. *et al.* A chemoattractant cytokine associated with granulomas in tuberculosis and silicosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.94, p.6414-19, 1997.
- NESTERENKO, M.V.; TILLEY, M.; UPTON, S.J. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. **J. Biochem. Biophys. Methods** v.28, n.3, p.239-42, 1994.
- O' HAGAN, D.T.; JEFFERY, H.; DAVIS, S.S. Long-Term antibody responses in mice following subcutaneous immunization with ovalbumin entrapped in biodegradable microparticles. **Vaccine** v.11, p.965-969, 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.
- ODDO, M.; RENNO, T.; ATTINGER, A. *et al.* Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Immunol.** v.160, p.5448-54, 1998.
- OGATA, K.; LINZER, B.A.; ZUBERI, R.I. *et al.* Activity of Defensins from human neutrophilic granulocytes against *Mycobacterium avium*- *Mycobacterium intracellulare*. **Infect. Immun.** v.60, p.4720-5, 1992.
- OPPMANN, B.; LESLEY, R.; BLOM, 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.
- PARRISH, N.M.; DICK, J.D.; BISHAI, W.R. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends Microbiol.** v.6, n.3, p.107-12, 1998.
- PEPYS, M.B.; HAWKINS, P.N.; KAHAN, M.C. *et al.* Proinflammatory effects of bacterial recombinant human C-reactive protein are caused by contamination with bacterial products, not by C-reactive protein itself. **Circ. Res.** v.97, p.97-103, 2005.
- PEREZ *et al.*, An essential role for pop in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. **Mol. Microbiol.** v.41, p.179-187, 2001.
- PERRONNE, C. Association of tuberculosis and HIV infection. **Presse Med.** v.23, n.16, p.731-3, 1994.
- PERSING, D.H.; COLER, R.N.; LACY, M.J. *et al.* Taking toll: lipid A mimetics as adjuvants and immunomodulators. **Trends Microbiol.** v.10, n.5, p.332-7, 2002.
- PETERS, W.; CYSTER, J.G.; MACK, M. *et al.* CCR2-dependent trafficking of F4/80dim macrophages and D11cdim/intermediate dendritic cells is crucial for T cell recruitment to lungs infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Immunol.** v.172, p.7647-53, 2004.
- RANKIN, R.; PONTAROLLO, R.; IOANNOU, X. *et al.* CpG motif identification for veterinary and laboratory species demonstrates that sequence recognition is highly conserved. **Antisense Nucleic Acid Drug Dev.** v.11, n.5, p.333-40, 2001.
- RATCLIFFE, L.T.; LUKEY, P.T.; MACKENZIE, C.R. *et al.* Reduced NK activity correlates with active disease in HIV patients with multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. **Clin. Exp. Immunol.** v.97, p.373-9, 1994.
- RAYCHAUDHURI, S.; ROCK, K.L. Fully mobilizing host defense: building better vaccines. **Nat. Biotechnol.** v.16, n.11, p.1025-31, 1998.
- RESCIGNO, M.; GRANUCCI, F.; CITTERIO, S. *et al.* Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. **Immunol. Today** v.20, n.5, p.200-3, 1999.

- RIEDER, H.L. Epidemiology of tuberculosis in Europe. **Europ. Resp. J.** v.8, n.20, p.620s-632s, 1995.
- ROBERTS, B.; HIRST, R. Identification and characterisation of a superoxide dismutase and catalase from *Mycobacterium ulcerans*. **J. Med. Microbiol.** v.45, n.5, p.383-7, 1996.
- ROOK, G.A.W.; DHEDA, K.; ZUMLA, A. Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. **Nat. Rev.** v.5, p.661-7, 2005.
- ROOK, G.A.W.; DHEDA, K.; ZUMLA, A. Do successful tuberculosis vaccines need to be immunoregulatory rather than merely Th1-boosting? **Vaccine** v.23, p.2115–2120, 2005.
- RUBERTI, M.; DE MELO, L.K.; DOS SANTOS, S.A. *et al.* Prime-boost vaccination based on DNA and protein-loaded microspheres for tuberculosis prevention. **J. Drug Target** v.12, n.4, p.195-203, 2004.
- RUDBACH, J.; JOHNSON, D.A.; ULRICH, J.T. Ribi adjuvants: chemistry, biology and utility in vaccines for human and veterinary medicine. In: The theory and practical application of adjuvants (D.E.S. Stewart-Tull, Ed.), p.287-313. Wiley, New York, 1995.
- RUSSEL, D.G. Of microbes and macrophages: entry, survival and persistence. **Curr. Opin. Immunol.** v.7, p.479-84, 1995.
- SALGAME, P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Current Opinion in Immunology** v.17, p.374–380, 2005.
- SALGAME, P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Current Opinion in Immunology** v.17, p.374–80, 2005.
- SATO, K.; AKAKI, T.; TOMIOKA, H. Differential potentiation of anti-mycobacterial activity and reactive nitrogen intermediate producing ability of murine peritoneal macrophages activated by interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ). **Clin. Exp. Immunol.** v.112, p.63-8, 1998.
- SCHAIBLE, U.E.; COLLINS, H.; KAUFMANN, S.H.E. Confrontation between intracellular bacteria and the immune system. **Sdv. Immunol.** v.71, p.267-377, 1999.
- SCHAIBLE, U.E.; WINAU, F.; SIELING, P.A. *et al.* Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. **Nat. Med.** v.9, n.8, p.1039-46, 2003.
- SCHITTEK, B.; HIPFEL, R.; SAUER, B. *et al.* Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. **Nat. Immunol.** v.2, n.12, p.1133–7, 2001.
- SCHLESINGER, L.S. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. **J. Immunol.** v.150, p.2920-30, 1993.
- SCHLESINGER, L.S. Role of mononuclear phagocytes in *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. **J. Invest. Med.** v.44, p.312-23, 1996.
- SCHMIDT, W.; BUSCHLE, M.; ZAUNER, W. *et al.* Cell-free tumour antigen peptide-based cancer vaccine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.94, p.3262–7, 1997.
- SERBINA, N.V.; FLYNN, J.L. Early emergence of CD8<sup>+</sup> T cells primed for production of type 1 cytokines in the lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. **Infect. Immun.** v.67, p.3980-8, 1999.
- SERBINA, N.V.; LIU, C.C.; SCANGA, C.A. *et al.* CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes from lungs of *Mycobacterium tuberculosis* infected mice express perforin in vivo and lyse infected macrophages. **J. Immunol.** v.165, p.353-63, 2000.
- SHINNICK, T.M. Heat shock proteins as antigens of bacterial and parasitic pathogens. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** v.167, p.145-60, 1991.

- SILVA, C.L.; FACCIOLI, L.H.; FOSS, N.T. Suppression of human monocyte cytokine release by phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. **Int. J. Lepr.** v.61, p.107-8, 1993.
- SILVA, C.L.; LOWRIE, D.B. A single mycobacterial protein (hsp65) expressed by a transgenic antigen-presenting cell vaccinates mice against tuberculosis. **Immunology** v.82, p.244-248, 1994.
- SILVA, C.L.; SILVA, M.F.; PIETRO, R.C.L.R. LOWRIE, D.B. Protection against tuberculosis by passive transfer with T cell clones recognizing mycobacterial heat-shock protein 65. **Immunology** v.83, p.341-346, 1994.
- SILVA, C.L.; SILVA, M.F.; PIETRO, R.C.L.R.; LOWRIE, D.B. 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.2400-2407, 1996.
- SILVA, C.L.; BONATO, V.L.D.; LIMA, V.M.F. *et al.* Characterization of the memory/activated T cells that mediate the long-lived host response against tuberculosis after bacillus Calmette-Guerin or DNA vaccination. **Immunology** v.97, n.4, p.573-81, 1999.
- SILVA, C.L.; LOWRIE, D. Identification and characterization of murine cytotoxic T cells that kill *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect Immun.** v.68, n.6, p.3269-74, 2000.
- SILVA, C.L.; BONATO, V.L.D.; LIMA, K.M.; COELHO-CASTELO, A.A.M. *et al.* Cytotoxic T cells and mycobacteria. **FEMS Microbiol. Lett.** v.197, p.11-18, 2001.
- SINGH, M.; OTT, G.; KAZAZ, J. *et al.* Cationic microparticles are an effective delivery system for immune stimulatory cpG DNA. **Pharm. Res.** v.18, n.10, p.1476-9, 2001.
- 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, S.M.; MALIN, A.S.; LUKEY, P.T. *et al.* Characterization of human *Mycobacterium bovis* bacilli-Calmette-Guérin-reactive CD8<sup>+</sup> T cells. **Infect. Immun.** v.67, p.5223-30, 1999.
- SMITH, D.A.; PARISH, I.; STOKER, N.G.; BANCROTT, G.J. Characterization of auxotrophic mutants of *Mycobacterium tuberculosis* and their potential as vaccine candidates. **Infect. Immun.** v.69, p.1142-1150, 2001.
- SUGAWARA, I.; YAMADA, H.; KANEKO, H. *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.
- TAN, J.S.; CANADAY, D.H.; BOOM, W.H. *et al.* Human alveolar T lymphocyte responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens: role for CD4 and CD8 cytotoxic T cells and relative resistance of alveolar macrophages to lysis. **J. Immunol.** v.159, p.290-7, 1997.
- TANG, Y.Q.; YEAMAN, M.R.; SELSTED, M.E. Antimicrobial peptides from human platelets. **Infect. Immun.** v.70, n.12, p.6524-33, 2002.
- TANI, K.; MURPHY, W.J.; CHERTOV, O. *et al.* Defensins act as potent adjuvants that promote cellular and humoral immune responses in mice to a lymphoma idiotypic and carrier antigens. **Int. Immunol.** v.12, n.5, p.691-700, 2000.
- TASIEMSKI, A.; HAMMAD, H.; VANDENBULCKE, F. *et al.* Presence of chromogranin-derived antimicrobial peptides in plasma during coronary artery bypass surgery and evidence of an immune origin of these peptides. **Blood** v.100, n.2, p.553-9, 2002.

- TAZI, A.; BOUCHONNET, F.; VALEYRE, D. *et al.* Characterization of  $\gamma\delta$  T lymphocytes in peripheral blood of patients with active tuberculosis. **Am. Rev. Respir. Dis.** v.146, p.1216-21, 1992.
- THOMA-USZYNSKI, S.; STENGER, S.; MODLIN, R.L. CTL-mediated killing of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* is independent of target cell nuclear apoptosis. **J. Immunol.** v.165, p.5773-5779, 2000.
- TOKUNAGA, T.; YAMAMOTO, H.; SHIMADA, S. *et al.* Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. **J Natl. Cancer Inst.** v.72, n.4, p.955-62, 1984.
- TOYO-SODA, Japanese patent, J 1196294, 1989.
- TRINCHIERI, G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ ). **Curr. Opin. Immunol.** v.9, p.17-23, 1997.
- TSUKAGUCHI, K.; BALAJI, K.N.; BOOM, W.H. CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T cell and  $\gamma\delta$  T cells response to *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Immunol.** v.154, p.1786-96, 1995.
- TURNER, J.; DOCKRELL, H.M. Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with live mycobacterium bovis BCG activates cytolytic CD8<sup>+</sup> T-cells in vitro. **Immunology** v.87, p.339-42, 1996.
- UETA, C.; TSUYUGUCHI, I.; KAWASUMI, H. *et al.* Increase of gamma/delta T cells in hospital workers who are in close contact with tuberculosis patients. **Infect. Immun.** v.62, n.12, p.5434-41, 1994.
- UNDERHILL, D.M.; OZINSKY, A.; SMITH, K.D. *et al.* Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.96, p.14459-63, 1999.
- ULMER, J.B.; DONNELLY, J.J.; PARKER, S.E. *et al.* Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. **Science** v.259, n.5102, p.1745-9, 1993.
- van'T HOF, W.; VEERMAN, E.C.; HELMERHORST, E.J.; *et al.* Antimicrobial peptides: properties and applicability. **Biol Chem**, v. 382, n.4, p.597-619, 2001.
- VANLANDSCHOOT, P.; VAN HOUTTE, F.; ULRICHTS, P. *et al.* Immunostimulatory potential of hepatitis B nucleocapsid preparations: lipopolysaccharide contamination should not be overlooked. **Journal of General Virology** v.86, p.323-31, 2005.
- VIDARD, L.; KOVACSOVICS-BANKOWSKI, M.; KRAEFT, S.K. *et al.* Analysis of MHC class II presentation of particulate antigens of B lymphocytes. **J Immunol.** v.156, n.8, p.2809-18, 1996.
- WAECKERLE-MEN, Y.; GROETTRUP, M. PLGA microspheres for improved antigen delivery to dendritic cells as cellular vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews** v.57, p.475-482, 2005.
- WALKER, L.; LOWRIE, D.B. Killing of *Mycobacterium microti* by immunologically activated macrophages. **Nature** v.293, p.69-70, 1981.
- WALKER, L.; LOWRIE, D.B. Killing of *Mycobacterium microti* by immunologically activated macrophages. **Nature** v.293, n.5827, p.69-71, 1981.
- WOLFF, J.A.; MALONE, R.W.; WILLIAMS, P. *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. **Science** v.247, n.4949, p.1465-8, 1990.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing (World Health Organization, 2004).
- WRIGHT, S.D.; SILVERSTEIN, S.C. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. **J. Exp. Med.** v.158, p.2016-23, 1983.
- YANG, D.; BIRAGYN, A.; KWAK, L.W. *et al.* Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. **Trends Immunol.** v.23, n.6, p.291-6, 2002.

- YANG, J.; MITSUYAMA, M. An essential role for endogenous interferon- $\gamma$  in the generation of protective T cells against *Mycobacterium bovis* BCG in mice. **J. Immunol.** v.91, p.529-35, 1997.
- YI, A.K.; HORNBECK, P.; LAFRENS, D.E. *et al.* CpG DNA rescue of murine B lymphoma cells from anti-IgM induced growth arrest and programmed cell death is associated with increased expression of c-myc and bcl-XL. **J. Immunol.** v.157, p.4918-25, 1996.
- YOUNG, R.A. Stress proteins and immunobiology. **Ann. Rev. Immunol.** v.8, p.401-20, 1990.
- YOUNG, D.B.; STEWART, G.R. Tuberculosis vaccines. **Br. Med Bull.** v.62, p.73-86, 2002.
- ZAIYOU, M.; GALLO, R.L. Cathelicidins, essential gene-encoded mammalian antibiotics. **J. Mol. Med.** v.80, n.9, p.549-61, 2002.
- ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides in health and disease. **N. Engl. J. Med.** v.347, n.15, p.1199-200, 2002.
- ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature** v.415, n.6870, p.389-95, 2005.
- ZHANG, M.; GATELY, M.K.; WANG, E. *et al.* Interleukin 12 at the site of disease in tuberculosis. **J. Clin. Invest.** v.93, p.1733-9, 1994.
- ZHU, X.; VENKATAPRASAD, N.; THANGARAJ, H.S. *et al.* Functions and specificity of T cells following nucleic acid vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J. Immunol.** v.158, n.12, p.5921-6, 1997.

## **9. APÊNDICES**

**Apêndice I:** Análise dos cortes histológicos do pulmão de animais infectados por *Mycobacterium tuberculosis* por via intratraqueal 30 ou 90 dias após a vacinação com microesferas contendo rHsp65a e diferentes imunoestimulantes

Formulações	Infecção 30 dias após a vacinação							Infecção 90 dias após a vacinação						
	salina	vazia	P	K	H	H+P	H+K	salina	vazia	P	K	H	H+P	H+K
<b>Comprometimento do parênquima pulmonar (%)</b>	60-70	10-40	20-50	20-30	20-40	30-50	5-20	< 5	5-20	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
<b>Infiltrado linfocitário perivascular e peribronquial</b>	sim	sim	pouco	sim	pouco	sim	sim	sim	sim	sim	pouco	sim	sim	sim
<b>Infiltrado de macrófagos</b>	sim	pouco	sim	sim	sim	sim	pouco	pouco	sim	pouco	sim	sim	pouco	pouco
<b>Granulomas confluentes</b>	sim	não	sim	sim	sim	poucos	não	não	não	não	não	não	não	não
<b>Granulomas isolados</b>	não	sim	sim	sim	poucos	sim	poucos	poucos	poucos	poucos	poucos	poucos	poucos	poucos
<b>Quantidade de bacilos</b>	+++	+++	+	++	++	++	+	*	*	+	+	*	+	+

P: Me-Poliarginina; K: Me-KLK; H: Me-Hsp65a; H+P: Me-Hsp65a+Poliarginina, H+K: Me-Hsp65a+KLK.

\*não foram encontrados bacilos nos cortes analisados

+ pouca

++ moderada

+++ grande

**Apêndice 2:** Análise dos cortes histológicos do pulmão de animais infectados por *Mycobacterium tuberculosis* por via intratraqueal 30 ou 90 dias após a vacinação com microesferas contendo rHsp65b e diferentes imunostimulantes

Formulações	Infecção 30 dias após a vacinação									Infecção 90 dias após a vacinação								
	S	V	P	K	C	H	H+P	H+K	H+C	S	V	P	K	C	H	H+P	H+K	H+C
<b>Comprometimento do parênquima pulmonar (%)</b>	40-60	20-40	40-50	60-70	70-75	10-85	10-60	5-15	45-50	50-60	20-35	50-65	25-30	40-60	30	10-20	0-40	5-25
<b>Infiltrado linfocitário perivascular e peribronquial</b>	pouco	pouco	pouco	sim	pouco	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	pouco	sim	sim
<b>Infiltrado de macrófagos</b>	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
<b>Granulomas confluentes</b>	poucos	poucos	poucos	sim	sim	sim	sim	não	poucos	sim	poucos	poucos	sim	sim	não	não	poucos	poucos
<b>Granulomas isolados</b>	sim	sim	sim	poucos	poucos	sim	poucos	sim	sim	poucos	sim	sim	sim	não	poucos	sim	sim	sim
<b>Exudato neutrofílico</b>	não	pouco	pouco	sim	pouco	sim	pouco	pouco	pouco	não	pouco	pouco	pouco	pouco	pouco	pouco	pouco	pouco
<b>Edema</b>	não	sim	pouco	pouco	pouco	sim	pouco	não	sim	não	sim	pouco	pouco	sim	pouco	pouco	pouco	pouco
<b>Congestão</b>	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	não	sim	sim	sim	sim	sim	sim
<b>Focos hemorrágicos</b>	sim	não	sim	sim	sim	sim	sim	poucos	poucos	sim	sim	não	sim	sim	sim	sim	poucos	sim
<b>Quantidade de bacilos</b>	++	+++	+++	++	+++	++	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+

S: salina; V: Me-vazia; P: Me-Poliarginina; K: Me-KLK; H: Me-Hsp65b; H+P: Me-Hsp65b+Poliarginina, H+K: Me-Hsp65b+KLK; H+C: Me-Hsp65b+CpG.  
+ pouca; ++ moderada; +++ grande.

# 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](#)