

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp

Faculdade de Medicina de Botucatu

**EFEITO DE MICOBACTÉRIA AMBIENTAL (*Mycobacterium avium*) NA
IMUNIDADE INDUZIDA PELA VACINA GÊNICA PARA TUBERCULOSE
(pVAXhsp65)**

Douglas Rodrigues Martins

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu
para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Alexandrina Sartori

Botucatu
2006

*“Não devemos cessar a exploração
E quando chegarmos ao seu fim
Deveremos chegar onde começamos
E conhecer o lugar pela primeira vez”
Thomas S. Eliot*

Dedicatórias

Dedico este trabalho:

À Profa. Dra. Alexandrina Sartori

Aproveito este singelo espaço em uma simples folha para expressar publicamente, minha gratidão! Falar de seus atributos profissionais, científicos e afins seria redundância, pois a frequência com a qual é requisitada para aulas, palestras e o carinho com o qual é tratada, não deixam dúvidas sobre o que aqui escrevo. Para mim, sem exageros sua influência foi muito além dessas peculiaridades! Ela depositou em mim um voto de confiança, o qual fiz questão de honrar e com isso ajudou a resgatar parte de minha auto-estima, afinal de contas eu naquele exato momento (período que ingressei na Pós) passava por um momento delicado! Além disso, seu papel não se restringiu somente à orientação teórico-prática foi muito além... atingiu profundamente a dimensão humana de meu ser. Este trabalho é apenas uma demonstração do que podemos fazer em grupo...

Namastê!

*À minha família
Daquela de onde vim
Para aquela aonde fui
Joselaine e Giovana
Para sempre um só,
Amor!*

Pensar em Você

*É só pensar em você
Que muda o dia
Minha alegria dá pra ver
Não dá pra esconder
Nem quero pensar se é certo querer
O que vou lhe dizer
Um beijo seu
E eu vou só pensar em você
Se a chuva cai e o sol não sai
Penso em você vontade de viver mais
Em paz com o mundo e comigo
Se a chuva cai e o sol não sai
Penso em você vontade de viver mais
Em paz com o mundo e consigo
É só pensar em você*

04/09/05
Chico César 1.05

Agradecimientos

À minha família...de “A” a “Z”. Preferi não nomeá-los, não por displicência, mas sim para não cometer injustiças. Amo vocês;

Aos meus colegas de Guarantã e ao belo time que formamos (Campeões do Torneio Independência de Futebol Society – 2007). Também, aos colegas de Botucatu, àqueles que conheci e especialmente com os quais convivi, André Nascimento, Justulin, Márcio, Ioschua, Rogério, Fernando e Delso (meu conterrâneo);

Aos colegas de Laboratório, Tatiana, Erica, Sofia, Bruna, Juliana, Lucélia, Thaís, Larissa, Clara, Fernanda e especialmente a Ana Cláudia Pelizon que me apoiou durante toda minha trajetória e à Dra Alexandrina Sartori por ter confiado em mim e também pela habilidade com a qual conduziu todos seus orientandos;

A todos meus colegas de Pós-Graduação deste e de outros Deptos desta Instituição e de outras instituições;

Ao CPT e à Rede TB na pessoa do Prof. Célio Lopes Silva, pelo exemplo profissional e pela oportunidade de poder fazer parte das pesquisas com a vacina gênica e tornar este trabalho viável. À Professora Vânia Luiza D. Bonato pelas sugestões e por disponibilizar seu laboratório. A todos os pós-graduandos do CPT em especial a Rubens R dos Santos Júnior, Denise M da Fonseca e Tatiana Schneider pela amizade, pela ajuda nos experimentos e pelo conhecimento compartilhado. À Ana Paula Masson e Izaira T. Brandão pelo fornecimento da vacina e rhsp65, pela ajuda nos experimentos, além de toda atenção dispensada durante nossas passagens por Ribeirão.

Aos professores do Depto. de Microbiologia e Imunologia, Dra. Ângela M. V. Campos Soares, Dr. José Maurício Sforcin, Dr Sílvio Luís de Oliveira e especialmente ao Dr. Ramon Kaneno e Dra. Maria Terezinha S. Peraçoli pelas valiosas sugestões durante meu exame de qualificação e por lançarem perspectivas de continuidade sobre esta linha de pesquisa e conseqüentemente sobre meu futuro acadêmico;

Aos funcionários do Depto. de Microbiologia e Imunologia, Leonice A. Garcia, Luiz Alquati, Sônia Faraldo pelo apoio técnico-científico e especialmente a Luiz S. dos Santos, carinhosamente chamado de “lulinha” o qual me rebatizou, e hoje me chama por “douglinha”;

À Dra Jussara M. Machado pelas valiosas sugestões que sem dúvida alguma nos possibilitou aprimorar o delineamento experimental deste trabalho e lançou perspectivas de continuidade desta linha de pesquisa;

Aos docentes do Depto. de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, em especial aos doutores Domingos Alves Meira, Jussara M. Machado e Paulo C. Marques Pereira pelo reforço e pela construção de valores científicos e humanos que coexistem em mim;

Aos funcionários do Depto. de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, em especial à Solange S. Cagliari;

Aos colegas, docentes e técnicos do Depto. Morfologia – IBB em especial a Luis A. Justulin Jr. pela valiosa contribuição científica que resultou na melhoria deste trabalho;

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação, Andréa P. L. Devidé, Janete A. H. Silva, Nathanael P. Salles e Regina Célia Spadin;

Às agências de fomento a pesquisa, em especial à CAPES pela bolsa concedida e à FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro;

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e que acima de tudo, influenciaram em minha formação;

Muito obrigado!

Sumário

RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Resposta imune na tuberculose.....	19
1.2. Vacinas para tuberculose.....	21
1.3. Estudos pré-clínicos com DNAhsp65.....	26
2. OBJETIVOS.....	28
2.1. Objetivo geral.....	29
2.2. Objetivos específicos.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1. Animais.....	31
3.2. <i>Mycobacterium avium</i>	31
3.3. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	31
3.4. Obtenção dos plasmídeos pVAX e pVAXhsp65.....	31
3.5. Obtenção da rhsp65.....	32
3.6. Imunizações.....	33
3.6.1. <i>M. avium</i>	33
3.6.2. DNAhsp65.....	33
3.6.3. Estratégia <i>M. avium</i> /DNAhsp65.....	33
3.7. Reação de Hipersensibilidade Tardia.....	33
3.8. Obtenção de soros e sobrenadantes de culturas	34
3.9. Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	34
3.9.1. Para dosagem de anticorpos.....	34
3.9.2 Para dosagem de citocinas em sobrenadantes.....	35
3.10. Preparo de <i>M. tuberculosis</i> e infecção experimental.....	35
3.11. Determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC).....	36
3.12. Análise histológica dos pulmões.....	37
3.13. Análise estatística.....	37
4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS E RESULTADOS.....	38
4.1. Protocolo 1.....	39

4.1.1. Reação de hipersensibilidade tardia e produção de anticorpos e citocinas.....	40
4.2. Protocolo 2.....	44
4.2.1. Produção de anticorpos e citocinas.....	45
4.3. Protocolo 3.....	51
4.3.1. Quantificação de carga bacteriana e análise histopatológica pulmonar.....	52
5. DISCUSSÃO.....	58
6. CONCLUSÕES.....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
8. LISTA DE ABREVIATURAS.....	79
9. ANEXO.....	83

Resumo

EFEITO DE MICOBACTÉRIA AMBIENTAL (*Mycobacterium avium*) NA IMUNIDADE INDUZIDA PELA VACINA GÊNICA PARA TUBERCULOSE (pVAXhsp65)

A eficácia da vacina BCG (*Mycobacterium bovis* atenuado) contra tuberculose pulmonar apresenta grande variabilidade em diferentes populações. Dentre as hipóteses sugeridas, prevalece a que atribui esta variação às interações entre a vacina e micobactérias presentes no meio ambiente. Estudos têm demonstrado que antígenos expressos pelo BCG estão conservados no *M. avium*, corroborando com a hipótese de que a exposição às micobactérias ambientais gera resposta imune cruzada que interfere com a eficácia do BCG. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da exposição prévia de camundongos ao *M. avium* inativado na resposta imune e eficácia protetora induzidas pela vacina DNAhsp65 (pVAXhsp65) na tuberculose experimental murina. Na primeira etapa, grupos de camundongos BALB/c fêmeas foram injetados com diferentes doses ($0,08 \times 10^6$, 4×10^6 e 200×10^6) de *M. avium* inativado termicamente, pela via subcutânea. Após três semanas, os animais foram imunizados com DNAhsp65 por via intramuscular. Os animais receberam três doses de DNA ($100 \mu\text{g}$ /intervalos de 15 dias). Grupos controle receberam somente *M. avium*, vacina (pVAXhsp65), vetor (pVAX) ou solução salina estéril. A produção de citocinas e os níveis de anticorpos foram determinados por ELISA. Na segunda etapa, os animais foram inicialmente sensibilizados por via subcutânea com 200×10^6 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *M. avium* inativado e depois imunizados com três doses de pVAXhsp65 ($100 \mu\text{g}$ /intervalos de 15 dias) por via intramuscular. Os grupos controle foram injetados com salina, pVAX (4 doses), pVAXhsp65 (4 doses), *M. avium*, *M. avium* mais pVAX (3 doses) ou *M. avium* mais pVAXhsp65 (3 doses). Quinze dias após a última dose de DNA os animais foram infectados com 1×10^4 UFC de *M. tuberculosis*, H37Rv, pela via intratraqueal. Trinta dias após o desafio os animais foram sacrificados e a carga bacteriana determinada pelo número de UFC nos pulmões. Cortes histopatológicos dos pulmões também foram analisados. Células esplênicas de animais primados com *M. avium* produziram mais IL-5 e menos IFN- γ do que animais não primados. Além disso, o contato prévio com *M. avium* determinou aumento na produção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-hsp65. Este efeito foi mais

intenso nos animais injetados com dose mais elevada de micobactéria. Este efeito modulador do *M. avium* sobre a resposta imune induzida pela vacina DNAhsp65 não afetou a carga bacteriana nos pulmões, mas reduziu a preservação do parênquima pulmonar em comparação com o grupo imunizado somente com a DNAhsp65. Estes resultados indicam que micobactérias ambientais também podem afetar a imunidade induzida por vacinas de DNA, de forma similar ao observado na imunidade induzida pelo BCG.

Abstract

EFFECT OF ENVIRONMENTAL MYCOBACTERIA (*M. avium*) ON IMMUNITY INDUCED BY A DNA VACCINE (DNAhsp65) AGAINST TUBERCULOSIS

The efficacy of BCG vaccine (attenuated *Mycobacterium bovis*) against pulmonary tuberculosis varies enormously in different populations. The prevailing hypothesis attributes this variation to interactions between the vaccine and mycobacteria common in the environment. Studies have revealed that most protective antigens expressed by the antituberculous vaccine are conserved in *M. avium*, supporting the hypothesis that exposure to environmental mycobacteria generates a cross-reactive immune response that interferes with BCG efficacy. The objective of this investigation was to evaluate the effect of a prior exposure to heat killed *M. avium* on both, the immune response and the protective efficacy induced by a DNAhsp65 vaccine (pVAXhsp65) in experimental murine tuberculosis. To evaluate the effect on the immune response, BALB/c female mice were, initially, injected with distinct doses ($0,08 \times 10^4$, 4×10^6 and 200×10^6) of heat killed *M. avium* by subcutaneous route. Three weeks later the animals were immunized with 3 doses of DNAhsp65 by intramuscular route ($100 \mu\text{g}$ / 15 days apart). Control groups received only *M. avium*, vaccine (pVaxhsp65), vector (pVax) or saline solution. Cytokine production and antibody levels were determined by ELISA. To evaluate the effect on the protective efficacy, animals were initially, sensitized with 2×10^8 heat killed CFU of *M. avium* by subcutaneous route and then immunized with 3 doses of pVAXhsp65 ($100 \mu\text{g}/15$ days apart) by intramuscular route. Control groups were injected with saline, pVAX (4 doses), pVAXhsp65 (4 doses), *M. avium*, *M. avium* plus pVAX (3 doses) or *M. avium* plus pVAXhsp65 (3 doses). Fifteen days after last DNA dose the animals were infected with 1×10^4 viable CFU of H37Rv *M. tuberculosis* by intratracheal route. Thirty days after challenge the animals were sacrificed and the bacterial burden was determined by the number of CFU in the lungs. Lung histological sections were also analysed. Splenic cells from primed animals produced more IL-5 but less IFN- γ than non primed ones. Also, prior contact with *M. avium* determined higher production of IgG1 and IgG2a anti-hsp65 antibodies in comparison to all control groups. However, this priming did not decrease the bacterial burden in the lungs. In addition, this prior sensitization with *M. avium*

decreased the parenchyma preservation observed in the group immunized only with pVaxhsp65. These results indicate that environmental mycobacteria can interfere with the immunity induced by genetic vaccines, in a similar way that they do in BCG induced immunity.

1. Introdução

1.1. Resposta imune na tuberculose

A tuberculose (TB) tem causado sofrimento e morte em seres humanos há milhares de anos. A TB já existia na América pré-Colombiana, no Pacífico Sul antes da chegada dos europeus e foi provavelmente uma importante causa de mortes no Egito há 4000 anos (1) e durante o século XIX nos Estados Unidos e Oeste Europeu (2). Embora a mortalidade tenha sido substancial no mundo industrializado nos últimos 150 anos, essa doença permanece como principal causa de morte em países de baixa renda, particularmente entre adultos e jovens (3,4).

Mais de um século depois da identificação do bacilo de Koch, a TB já matou mais de um bilhão de pessoas e acredita-se que 32% da população mundial esteja infectada com o bacilo (5). Atualmente, a TB é responsável pelo segundo maior índice de mortes atribuídas a doenças infecto-contagiosas, o que representa cerca de dois milhões de pessoas por ano. Estima-se que nos próximos 20 anos, haverá mais de um bilhão de pessoas infectadas com 36 milhões de óbitos (8). Segundo a última publicação da Organização Mundial da Saúde (WHO), em 2003 foram relatados, pelos 199 países participantes do controle de Tuberculose Mundial, 8,8 milhões de novos casos de tuberculose (140 casos por 100.000 habitantes). Neste contexto, o Brasil ocupa o 15º lugar no ranking de 22 países que, juntos, somam 80% dos casos de tuberculose mundial (6).

Nas últimas décadas ocorreu uma reemergência global da TB, associada à ineficiência dos sistemas de saúde, às condições de desnutrição e pobreza em determinadas regiões, o crescimento de fluxos migratórios, à dificuldade de adesão aos extensos esquemas terapêuticos e o surgimento de cepas de micobactérias multidroga resistentes e ao surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (7,8,9).

A resposta imune contra o agente etiológico da doença, *Mycobacterium tuberculosis*, é predominantemente celular. A micobactéria invade o hospedeiro através das vias aéreas, infecta o pulmão e logo depois é internalizada pelos macrófagos alveolares, causando inflamação no tecido pulmonar. Dentro dos macrófagos, que são células com alto potencial microbicida, os bacilos têm a habilidade de desativar os sistemas de defesa dessas células e conseguem

sobreviver e se multiplicar no seu interior. O sistema imunológico do homem reconhece a presença dos bacilos e estabelece uma resposta contra os mesmos, caracterizada por uma reação inflamatória crônica denominada granuloma e que tem como finalidade conter o crescimento bacteriano e prevenir que a infecção se dissemine, porém também protege os microrganismos contra a resposta imune, mantendo-os em estado de latência (10). Nestas condições os bacilos podem sobreviver anos e o indivíduo infectado pode não desenvolver a doença, que só se manifesta quando há um desequilíbrio dessa relação mútua e freqüentemente está associada com estados de depressão da resposta imunológica (11). Durante a resposta imune contra o patógeno os macrófagos têm papel fundamental, pois são responsáveis pelo processamento e apresentação de antígenos, uma vez que é dentro do fagossoma dessas células que o microorganismo fica dormente até voltar a replicar-se e causar a patologia. Além disso, têm função microbicida quando ativados por IFN- γ , pois secretam produtos intermediários de oxigênio e nitrogênio, como íon superóxido e óxido nítrico (12), que têm efeito bactericida. Mecanismos como restrição de ferro, acidificação do fagossoma e fusão do fagossoma com os lisossomas também contribuem para a inibição do crescimento micobacteriano (13).

Quatro populações de células T estão envolvidas na resposta imune contra o bacilo: TCD4+, TCD8+, T $\gamma\delta$ e T reconhecedoras de antígenos lipídicos apresentados por moléculas CD1 (T CD1 restritas). Todas elas são secretoras de IFN- γ e possuem propriedades citotóxicas (12). Os linfócitos T CD4+ são os maiores produtores de IFN- γ e de outras citocinas de perfil Th1 (IL-2, TNF- β). Acredita-se que estas células sejam as principais responsáveis pela proteção contra a infecção, pois o IFN- γ que secretam tem papel fundamental na ativação dos macrófagos, que são descritas como as principais células efetoras da resposta imune contra micobactérias (14). A participação das células TCD8+ contra a TB é uma descoberta mais recente. Capazes de lisar macrófagos infectados através da secreção de perforinas e granulinas, estas células liberam as bactérias intracelulares em estado latente dentro dos fagossomas, deixando-as suscetíveis ao ataque de macrófagos recém ativados (11,14). Os macrófagos infectados podem também, sofrer apoptose por interação com células T citotóxicas

via Fas / FasL e liberar as micobactérias dormentes as quais serão fagocitadas e destruídas por outros macrófagos ativados (11). As células T $\gamma\delta$ possuem capacidade de responder ao antígeno micobacteriano denominado derivado protéico purificado (PPD). Assim como as células T CD8+, essas células também secretam perforinas e granulinas que agem diretamente sobre as micobactérias sem a presença dos macrófagos. Isto também ocorre com as células T CD1 restritas que são células que reconhecem glicolipídios na parede celular das micobactérias apresentados por moléculas CD1 (15).

1.2. Vacinas para tuberculose

A atual vacina contra a TB, Bacilo de Calmette e Guérin (BCG), foi desenvolvida por cientistas franceses na primeira década do século passado (16). Em 1908, Camille Guérin e Albert Calmette iniciaram sua tentativa de produzir uma vacina para a TB. Após 230 repiques, estes pesquisadores obtiveram uma cepa atenuada a partir de uma cepa virulenta de *M. bovis*. Esta cepa, que perdeu a capacidade de induzir TB progressiva em modelos experimentais, tem sido utilizada na profilaxia contra a TB humana desde 1921 (17). Embora seja consenso que o BCG proteja crianças contra formas mais graves de tuberculose, como a miliar e a meníngea (18,19,20), estimativas sobre a proteção contra tuberculose pulmonar, em adultos, apontam para uma variação que vai de 0-80% (21). Apesar de sua extensa utilização, a eficácia desta vacina é muito discutida, havendo evidências de que este efeito protetor vai decaindo no decurso de 10 a 15 anos (18) e que a doença pulmonar do adulto não seria prevenida por vacinação neonatal, vacinação na adolescência e nem por uma estratégia de revacinação com BCG (22,23). Um estudo realizado em Chingleput, na Índia, envolvendo mais de 360.000 pessoas, demonstrou que o BCG não oferece proteção contra a TB pulmonar em adultos (24).

Muitas hipóteses têm sido sugeridas para explicar esta ineficiência do BCG em relação à tuberculose pulmonar, sendo que fatores diretamente relacionados com a vacina, como tratamento ou estocagem inadequados, bem como uso de cepas ineficazes de BCG (21). Após a primeira vacinação realizada com sucesso contra a TB, o BCG foi amplamente distribuído no mundo e a partir

de então, esta cepa foi propagada em vários laboratórios sob diferentes condições. Isso resultou em muitas alterações feno e genotípicas as quais foram detectadas pela comparação entre as várias cepas e também entre essas e a cepa original de BCG (25). Esta grande diversidade de cepas tem sido sugerida como uma das causas do índice variável de proteção determinado pelo BCG (26,27).

Esta ineficiência tem sido, alternativamente, atribuída a fatores imunológicos, ou seja, relacionados com a falta de estimulação adequada de linfócitos T, em especial de T CD8+, talvez por ausência de antígenos e/ou epítomos perdidos durante os subcultivos do BCG (28).

Outra hipótese atraente, e que é o foco da nossa proposta de trabalho, é a possível interferência de micobactérias ambientais (29). Esta idéia é antiga; Palmer & Long (30), sugeriram que infecções com micobactérias atípicas poderiam afetar o processo de vacinação com o BCG. Estes autores demonstraram que cobaias previamente expostas ao *M. fortuitum*, *M. avium* ou *M. kansasii* ficavam protegidas em graus variáveis contra o *M. tuberculosis*. Esta proteção era de 15, 50 e 80% respectivamente, em comparação com a proteção induzida pelo BCG. Em vários estudos subseqüentes foram observados resultados similares em cobaias e camundongos (31,32). Hernandez-Pando *et al.* (33), demonstraram que epítomos presentes nas micobactérias ambientais, os quais apresentaram reatividade cruzada com *M. tuberculosis*, poderiam induzir uma resposta imune protetora ou, pelo contrário, poderiam aumentar a susceptibilidade ao *M. tuberculosis*, dependendo da concentração da micobactéria utilizada. Baixa dose de *M. vaccae*, por via subcutânea, a qual evoca uma resposta tipo Th1, seria protetora, enquanto dose elevada, pela mesma via, induziria um padrão misto (Th1 + Th2 ou Th1 + Th0) determinando maior susceptibilidade a este patógeno.

Outras evidências dão suporte à hipótese da interferência das micobactérias ambientais. Por exemplo, é sabido que todas as populações humanas que habitam regiões tropicais ou temperadas são expostas a várias micobactérias que vivem no solo ou na água (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum* e *M. kansasii*). Apesar destas exposições raramente causarem doença, a não ser nos indivíduos imunossuprimidos, freqüentemente induzem reação de

hipersensibilidade tardia a antígenos micobacterianos, o que tem sido demonstrado por testes intradérmicos (34). Existem várias evidências em animais e em populações humanas que estas exposições determinam algum grau de proteção contra micobactérias virulentas (21,30). Além disso, tem sido observado que o BCG tende a determinar menor proteção em locais onde micobactérias são mais freqüentes. Por exemplo, a mesma vacina BCG (Glaxo 1077) forneceu um índice de proteção contra a TB maior ou igual a 50% na população inglesa, mas não determinou nenhuma proteção contra a TB pulmonar no distrito de Karonga, Malawi, onde a presença de micobactérias é muito mais elevada (22,35).

O efeito das micobactérias ambientais sobre a eficácia do BCG é um assunto bastante complexo e difícil de analisar em função das muitas variáveis. Fine & Vynnycky (36), fizeram uma análise teórica do efeito da imunidade heteróloga, desencadeada por micobactérias ambientais, na proteção determinada pelo BCG. Os referidos autores, baseados na análise de relatos anteriores, sugeriram três mecanismos distintos, com base na identidade e magnitude das respostas heteróloga e desencadeada pela vacina, para explicar esta interferência. Em uma primeira situação a resposta para o antígeno microbiano na natureza e para a vacina seria diferente qualitativamente. Neste caso não haveria efeito na eficácia da vacina. Na segunda situação, quando houvesse somente uma diferença quantitativa entre as respostas imunes induzidas, a eficácia da vacina seria reduzida. Nesta situação, sendo as duas respostas de magnitude similar, a previsão seria de indução mínima de imunidade pela vacina. Em uma terceira e última possibilidade a exposição heteróloga poderia bloquear a ação da vacina. Neste caso a eficácia da vacina seria reduzida e poderia mesmo parecer negativa. Segundo estes autores, esta imunidade heteróloga poderia explicar não só o baixíssimo grau de proteção observado em áreas com alta incidência de micobactérias ambientais (37), como também o aparente declínio da eficácia da vacina observado depois de sua aplicação (30). Outro aspecto que merece atenção pela sua relevância também foi levantado por Fine & Vynnycky (36). De acordo com um dos modelos propostos por estes autores, a vacinação prévia com BCG poderia bloquear o estabelecimento de uma infecção micobacteriana ambiental, a qual por si só forneceria mais proteção que o BCG. Um estudo

bastante recente realizado por Brandt *et al.* (29), confirmaram esta possibilidade, mostrando que a exposição a certas micobactérias ambientais induz uma resposta imune que controla a multiplicação do BCG e desta forma diminui a resposta imune, pois a indução desta resposta depende da replicação do BCG.

Este efeito inibidor das micobactérias no crescimento e atividade do BCG tem sido utilizado como um argumento importante para reforçar a utilização de vacinas de subunidades, as quais seriam, teoricamente, menos influenciadas por um contato prévio com micobactérias ambientais. Nesse contexto, uma variedade de antígenos obtidos de bactérias ou de filtrado de cultura bacteriana (38,39) como o Ag85A e 85B, MTP64, ESAT6, Hsp60, proteína R8307, antígeno micobacteriano rico em prolina 36 KDa ou 19 KDa e proteína 45 KDa demonstraram níveis de proteção em camundongos, similares aos obtidos com BCG, especialmente, quando combinados com adjuvante indutor de Th1 (38).

Várias preparações vacinais contra TB encontram-se em fase de testes clínicos, entre elas, incluem-se duas vacinas de subunidades, constituídas de proteínas recombinantes. Uma delas é baseada em proteína de fusão, Mtb32/Mtb39 ('Mtb72F') produzida pela Corixa Inc., que possui lipídeo A monofosforil (MPL), da Glaxo Smith Kline, como adjuvante (40). A outra vacina de proteína de fusão é a ESAT6/Ag85B desenvolvida pelo Statens Serum Institute de Copenhagen (41). Além disso, polipeptídeos multi-epítomos, bem como antígenos não protéicos, como ácidos micólicos e carboidratos farmacologicamente ativos estão sendo testados como candidatos a vacinas (42).

Uma estratégia recentemente adotada é a utilização de vacinas de DNA nos processos de imunização. Vacinas baseadas em DNA plasmídeos, contendo genes que codificam proteínas imunogênicas, e por isto também consideradas vacinas de subunidades, fornecem as informações necessárias para que ocorra síntese do antígeno pelo próprio organismo imunizado (45).

Vacinas de DNA são capazes de gerar uma resposta imune similar às vacinas constituídas por organismos vivos atenuados ou organismos vivos recombinantes, porém sem os riscos associados com o uso desses agentes infecciosos. Este tipo de vacina é composto por moléculas de DNA circular de dupla fita de origem bacteriana e que contém os seguintes componentes: gene

que codifica o antígeno, gene de resistência a antibióticos, origem de replicação bacteriana, um forte promotor gênico eucariótico e uma sequência de poliadenilação para finalizar a transcrição gênica e estabilizar o RNA mensageiro (44,45,46).

Em 1990, Wolff *et al.* (47), mostraram pela primeira vez, que a injeção por via intramuscular de um DNA plasmideal em solução, contendo genes para determinado polipeptídeo, induzia expressão dessa proteína em células musculares. Este estudo forneceu base para o conceito de que o uso de DNA procariótico *in vivo* poderia resultar na expressão direta da proteína na célula alvo. Em seguida, Ulmer *et al.* (48), relataram que a vacina de DNA contra o vírus da influenza conferia proteção, estimulando tanto a produção de anticorpos como a ativação de linfócitos T CD8⁺, o que confirmou a capacidade das vacinas de DNA em ativar respostas imunes humoral e celular específicas. Após a imunização por via intramuscular, o material genético pode ser capturado por células musculares (miócitos) ou por APCs. O DNA vacinal endocitado vai para o núcleo celular, onde é transcrito em RNA mensageiro e, posteriormente traduzido no citoplasma para que ocorra a síntese do antígeno protéico relacionado ao agente infeccioso (45,49).

Os primeiros alvos celulares são as células musculares (imunização intramuscular) e queratinócitos (imunização epidérmica por *gene gun*). O DNA também entra em contato com as APCs que estão presentes e com as que são atraídas para o local da inoculação. O *priming* do sistema imune envolve APCs como células dendríticas e células de Langerhans da pele, que endocitam o DNA em vesículas para subsequente transporte até o núcleo (50).

O DNA bacteriano possui propriedade adjuvante inerente, capaz de desencadear a produção de citocinas por APCs, por meio da interação com receptores TLR, por exemplo, TLR-9 presente na superfície do endossomo (51). Regiões do DNA bacteriano que interagem com o TLR-9 de camundongos possuem seis bases que contêm um dinucleotídeo, CpG não metilado, flanqueado por duas purinas na região 5' e duas pirimidinas na região 3': GACGTT (52). As principais citocinas induzidas via estimulação de TLR-9 são: IL-12 que estimula células NK a produzir IFN- γ e favorece o desenvolvimento de Th1, TNF- α e IL-6,

que favorecem a produção de anticorpos e também atuam na diferenciação de linfócitos T citotóxicos (53).

Vacinas de DNA estimulam ambas as vias de apresentação de antígenos, via exógena (restrita a MHC de classe II) e via endógena (restrita a MHC de classe I). A apresentação via MHC-I resulta em uma forte resposta imune mediada por células T CD8⁺, característica das vacinas gênicas e que faz estas formulações atrativas contra parasitas intracelulares. Em função dessa propriedade, as vacinas gênicas mimetizam patógenos vivos, em contraste com as vacinas constituídas de antígenos protéicos ou patógenos mortos, as quais são apresentadas pela via exógena, mediada por T CD4⁺, restrita a MHC-II (53).

1.3. Estudos pré-clínicos com DNAhsp65

A vacina utilizada na execução do nosso trabalho é denominada pVAXhsp65 e foi obtida pela inserção do gene que codifica a proteína hsp65 (heat shock protein) de *M. leprae* no vetor pVAX.

Em 1992 Silva *et al.* (54), realizaram pela primeira vez experimentos de imunização empregando uma linhagem de células monocíticas, transfectadas com vetores retrovirais contendo o gene da hsp65 de *M. leprae*. Demonstraram que esse processo era capaz de induzir células T CD4⁺ e T CD8⁺ antígeno-específicas. Posteriormente, esse mesmo grupo utilizou a imunização com DNA plasmideal (pcDNA-hsp65), demonstrando, pela primeira vez, que essa estratégia podia ser realizada com sucesso para as imunizações contra a tuberculose (55). Além disso, em camundongos desafiados com *M. tuberculosis* ou previamente infectados com os bacilos por via endovenosa, esta preparação apresentou, respectivamente, efeito profilático (56,57,58) e terapêutico (59), sugerindo seu uso potencial na TB.

A partir destas observações iniciais foi montado um Centro de Pesquisas em Tuberculose (CPT) na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), USP. Entre os estudos realizados pelo CPT destacam-se várias investigações pré-clínicas cujo objetivo geral tem sido otimizar esta vacina gênica para TB para validar seu emprego futuro em estudos clínicos. Coelho-Castelo *et al.* (60), demonstraram que além das células dendríticas, células B também foram capazes de expressar a proteína, e sugeriram a importância destas células na resposta

imune após o emprego desta vacina. Além disso, diferentes sistemas de vacinação para a indução de proteção contra TB experimental foram testados por Lima *et al.* (61), que constataram aumento no tempo de proteção ao envolver os plasmídeos em lipídeos catiônicos. Em estudos subseqüentes foram avaliadas propriedades terapêuticas da DNAhsp65. Bonato *et al.* (62), concluíram que camundongos infectados com *M. tuberculosis* e tratados com a vacina apresentaram melhora da resposta imune celular caracterizada pela recuperação da produção dos níveis de IFN- γ e TNF- α , com regulação positiva de CD18, CD28 e CD95 de células TCD8⁺ e redução nas lesões pulmonares decorrentes da infecção. Nesta mesma linha, foi também demonstrada a viabilidade da utilização da DNAhsp65 como imunoterápico associada a quimioterápicos. Neste esquema de tratamento essa associação foi a mais rápida e eficiente forma de tratamento na TB experimental (63). Recentemente, foi investigada a possibilidade desta construção se integrar ao genoma do hospedeiro. Nesse sentido Coelho-Castelo *et al.* (64), descreveram que o padrão de metilação do DNA plasmideal persistiu por pelo menos seis meses, sem haver replicação deste na célula do hospedeiro, descartando assim a integração de ambos.

É exatamente dentro deste contexto pré-clínico e do efeito das micobactérias ambientais na eficácia do BCG que se insere a presente proposta de trabalho. Nossa hipótese de trabalho é que o *M. avium*, escolhido como exemplo de micobactéria ambiental, possa afetar a imunogenicidade e a eficácia protetora da vacina DNAhsp65. Esta premissa é baseada no fato da DNAhsp65 conter um gene que codifica a hsp65, que é um antígeno comum entre micobactérias. Desta forma, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar se o *M. avium*, escolhido como um exemplo de antígeno micobacteriano ambiental, poderia alterar a imunogenicidade e a eficácia protetora da vacina DNAhsp65.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar se o *M. avium*, escolhido como um exemplo de antígeno micobacteriano ambiental altera a imunogenicidade e a eficácia protetora da vacina DNAhsp65.

2.2. Objetivos específicos:

Avaliação da imunogenicidade do *M. avium*;

Avaliação do efeito do *M. avium* na imunogenicidade da vacina DNAhsp65;

Avaliação do efeito do *M. avium* na eficácia protetora da vacina DNAhsp65.

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas adultas com 5 - 6 semanas de idade provenientes do Biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu. As condições de manutenção e manipulação dos animais foram aprovadas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 389).

3.2. *Mycobacterium avium*

A cepa de *Mycobacterium avium* (*M. avium*) ATCC-15769 foi mantida em meio de cultura líquido Mildebrook 7H9 enriquecido com ADC (BD Biosciences, Sparks, USA) a 37 °C, durante 10 dias. Todos os procedimentos envolvendo o bacilo até o momento de sua inativação foram realizados em laboratório de segurança nível III no Centro de Pesquisas em Tuberculose (CPT), USP de Ribeirão Preto.

3.3. *Mycobacterium tuberculosis*

A linhagem virulenta Rv (H37Rv – ATCC – 27294) de *Mycobacterium tuberculosis* foi mantida em meio de cultura líquido Mildebrook 7H9 enriquecido com ADC (BD Biosciences, Sparks, USA) a 37 °C, durante 10 dias. Após esse período a cultura foi repicada em meio sólido Lowenstein-Jensen (DIFCO Laboratories, Detroit, MI - USA) e mantida por 28 dias, sendo, posteriormente, mantidas a -70 °C. Todos os procedimentos envolvendo o bacilo foram realizados em laboratório de segurança nível III, no Centro de Pesquisas em Tuberculose (CPT), USP de Ribeirão Preto.

3.4. Obtenção dos plasmídeos pVAX e pVAXhsp65

A purificação de cada DNA recombinante utilizado foi realizada seguindo-se o protocolo do KIT CONCERT HIGH PURITY (LIFE TECHNOLOGIES), que se baseia na purificação de plasmídeos em colunas de resina de troca iônica. Inicialmente a bactéria *Escherichia coli* transformada foi colocada em cultura por 6-8 horas, sob agitação, em meio LB contendo 50 µg/ml de Kanamicina. Partindo-

se de uma diluição 1:1000 deste crescimento, foi realizada uma cultura durante uma noite, a 37° C, sob agitação. Após centrifugação foi adicionado tampão de lise alcalina ao sedimento, seguido de tampão de neutralização. O material foi centrifugado durante 15 minutos em temperatura ambiente, para posterior coleta do sobrenadante. A coluna foi equilibrada em tampão apropriado e a seguir foi aplicado o sobrenadante. A coluna foi então lavada e o plasmídeo foi eluído e posteriormente precipitado com isopropanol. O sedimento foi ressuspenso em tampão T.E. e a concentração do DNA foi determinada por dosagem em GENE QUANT (PHARMACIA). A análise da integridade do DNA foi realizada em gel de agarose 0,8% e a quantidade de endotoxina foi dosada com o kit Quantitative Chromogenic (LAL, Walkersville, MD, USA).

3.5. Obtenção da rhsp65

Para obtenção da proteína recombinante foi utilizada *E. coli* previamente transformada com o vetor PUC18 expressando hsp65. Uma colônia desta bactéria foi cultivada em meio LB (GIBCO BRL) contendo ampicilina na concentração de 100 mg/mL (SIGMA). Após atingir uma D.O. (600 nm)= 0,6 (equivalente a 10⁸ bactérias/mL), foi adicionado IPTG (isopropil β-tiogalactosídeo) (Invitrogen) na cultura para induzir a expressão da proteína hsp65. Após a indução, a cultura foi centrifugada e submetida a ciclos de sonicação utilizando sonda de ultrassom Vibra CellTM (Sonic & Materials, USA) em banho de gelo. Após centrifugação a 16500 rpm 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 a temperatura ambiente por 15 minutos e então centrifugada a 16500 rpm por 20 minutos. Adicionou-se sulfato de amônio 1 M ao sobrenadante e incubou-se em gelo por 30 minutos. Após nova centrifugação, o sedimento foi ressuspenso em 3 mL de PBS e exaustivamente dialisado contra PBS. A visualização da proteína foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida por coloração com azul de Coomassie. O material foi aliquoteado e congelado a -80° C.

3.6. Imunizações

3.6.1. *M. avium*

A suspensão concentrada de *M. avium* foi inativada por processo de autoclavação durante 30 minutos a 120°C e este material foi estocado a 4 °C. Para as imunizações, essa suspensão foi ajustada para três diferentes concentrações segundo a escala de McFarland.

Camundongos BALB/c foram imunizados com 100 µL das diferentes concentrações ($0,8 \times 10^6$, 40×10^6 ou 2000×10^6 UFC/mL), por via subcutânea, na base da cauda.

3.6.2. DNAhsp65

Os plasmídeos pVAX (vetor) e pVAXhsp65 (vacina) purificados foram diluídos em PBS e suas concentrações acertadas para 2 µg/µL. A estas soluções acrescentou-se sacarose (concentração final de 10%). Cada animal recebeu 100 µL de preparação vacinal, contendo 100 µg de DNA, administrada no músculo quadríceps. O número total de doses variou segundo o protocolo: três no protocolo 2 e quatro doses no protocolo 3.

3.6.3. Estratégia *M. avium*/DNAhsp65

Camundongos BALB/c foram inicialmente imunizados com *M. avium* ($0,08 \times 10^6$, 4×10^6 ou 200×10^6 / animal), por via subcutânea na base da cauda. Após três semanas esses animais receberam três doses de vacina gênica como descrito no item 6.2.

3.7. Reação de Hipersensibilidade Tardia

Camundongos BALB/c previamente imunizados com *M. avium* foram inoculados no coxim plantar com 50 µL de *M. avium* inativado termicamente (1×10^7 UFC/animal). A espessura da pata dos animais inoculados foi medida com paquímetro (Peacock) antes da inoculação (0 hora) e após 72 horas. O aumento da espessura entre os dois períodos de leitura foi expresso em milímetros.

3.8. Obtenção de soros e sobrenadantes de culturas

Amostras de soro foram obtidas por punção retro-orbital após as imunizações. Os períodos nos quais foram obtidas as amostras estão informados nos protocolos experimentais. Os níveis de anticorpos anti-hsp65 (IgG2a e IgG1 e em um experimento IgA, Protocolo 2.2) foram determinados através da técnica de ELISA, descrita no item 9. Sobrenadantes de culturas de células esplênicas foram obtidos segundo a metodologia descrita a seguir. Após o sacrifício dos animais, os baços foram retirados, divulsionados, as suspensões celulares lavadas com RPMI incompleto e o sedimento celular coletado através de centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos. O número de células foi ajustado para 5×10^6 células/mL em meio RPMI 1640 contendo penicilina (100.000 U/mL) e 10% de soro bovino fetal. Em seguida, as células foram distribuídas em placas de 48 poços (1 mL). Posteriormente, foram adicionados diversos estímulos: ConA (10 μ g/mL); *M. avium* inativado por calor (1×10^7 UFC) e rhsp65 (10 μ g/mL). Após 48 horas de incubação a 37 °C em ambiente contendo 5% de CO₂, os sobrenadantes foram coletados e estocados a -20° C para posterior dosagem de citocinas.

3.9. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

3.9.1. Para dosagem de anticorpos

Placas de poliestireno (Nunc) de 96 poços foram inicialmente sensibilizadas com a proteína hsp65 recombinante: (5 μ g/mL) diluída em tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,05 M, (pH 9,6) e incubadas por 18 horas, a 4 °C. Posteriormente, as placas foram lavadas e incubadas com PBS contendo 0,25% BSA e 0,05% Tween 80 (Difco Laboratories) durante 1 hora, em temperatura ambiente. A essa etapa seguiu-se a adição das amostras, incubando-se por 1 hora a 37 °C. Após novas lavagens, anti-IgG1, anti-IgG2a e anti-IgA de camundongo (PharMingen) conjugados à biotina, diluídos 1:1000, foram adicionados e as placas foram incubadas por 1 hora, a 37 °C. A reação foi então revelada com o substrato H₂O₂ e o cromógeno OPD[®] (ortho-phenilenodiamina) e interrompida adicionando-se ácido sulfúrico 2 N. A leitura da absorbância foi realizada em 490 nm em leitor de ELISA.

3.9.2. Para dosagem de citocinas em sobrenadantes

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

Citocina	Anticorpo de captura	Anticorpo revelador
IFN- γ	AN18	C15.16
IL-5	TRKF5	TRFK4

Placas de 96 poços (Nunc) foram recobertas com solução contendo anticorpo purificado de captura anti-IFN- γ e IL-5 de camundongo (PharMingen), diluídos 1:1000 em tampão fosfato de sódio (pH 9.0). As placas foram incubadas a 4 °C, durante 12 h. Após cinco lavagens com solução PBS – Tween 20 (0.05%), foi adicionada a solução de bloqueio, constituída de PBS com 10% de soro bovino fetal, com incubação por 1 hora, a temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e incubadas durante 12 h, a 4 °C, com as amostras e com as respectivas curvas dos padrões de citocinas, diluídas na base dois em tampão PBS contendo 10% soro bovino fetal e 0.05% de Tween 20. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram lavadas e incubadas com os anticorpos anti-IFN- γ e IL-5 biotinilados, diluídos 1:1000 em tampão PBS contendo 10% de soro bovino fetal e 0.05% de Tween 20, durante 1 hora, a temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram incubadas com a solução AB (estreptoavidina + peroxidase) durante 30 minutos, a temperatura ambiente. As placas foram lavadas e a reação revelada com o substrato H₂O₂ e o cromógeno OPD[®] (ortho-phenilenodiamina) e interrompida adicionando-se ácido sulfúrico 2 N. A leitura da absorbância foi realizada em 490 nm em leitor de ELISA.

3.10. Preparo de *M. tuberculosis* e infecção experimental

A preparação do inóculo de *M. tuberculosis* H37Rv para a infecção experimental foi feita a partir de uma alíquota mantida a -70 °C. Duzentos microlitros deste material foram distribuídos em 10 mL de meio Middlebrook 7H9 enriquecido com ADC (BD Biosciences, Sparks, USA) e a cultura incubada por 7 dias a 37 °C. A suspensão de micobactérias foi centrifugada e a massa obtida ressuspensa em 2 mL de PBS estéril e agitada vigorosamente por 2 a 3 minutos

em tubo contendo pérolas de vidro. Desta suspensão foi retirada uma amostra de 100 µL que foi adicionada a 100 µL de diacetato de fluoresceína (2 µg/mL) e a 100 µL de brometo de etídeo (10 mg/mL), posteriormente, a viabilidade foi determinada em microscópio de fluorescência (Leica, Germany), segundo McDonough & Kress (65). Foram utilizadas alíquotas com viabilidade superior a 85% e o número de bacilos da suspensão foi determinado através da densidade óptica da cultura a 540 nm. A suspensão foi centrifugada a 3500 rpm por 20 minutos e o sedimento ressuspenso em 1 mL de solução salina estéril e agitado vigorosamente em tubo cônico com pérolas de vidro estéreis por 2 minutos.

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com 2,2,2 – Tribromoetanol 99% (ACROS, New Jersey, USA), na concentração de 2,5% em PBS, na dose de 250 mg/animal. Através da traquéia exposta foram injetados 100 µL da suspensão contendo 1×10^5 bacilos/mL (1×10^4 bacilos/animal).

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

Animais infectados, previamente imunizados ou não, foram sacrificados 30 dias após a infecção e os pulmões foram retirados e pesados. Após pesagem, o terceiro lóbulo do pulmão direito foi fragmentado e transferido para tubo contendo RPMI acrescido de Colagenase tipo IV (0,5 µg/mL) (Sigma St Louis, MO) e incubado durante 30 min a 37 °C. A suspensão celular obtida foi homogeneizada utilizando-se o aparelho Omni-Mixer, centrifugado a 1500 rpm por 10 min e o sobrenadante desprezado e o “pellet” ressuspenso em 1 mL de meio RPMI. A partir de uma alíquota de 100 µL foram feitas diluições em PBS de 10, 100, 1000 e 10000 vezes. Cem microlitros das diluições foram plaqueados em meio sólido 7H11 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) acrescido de ágar bacteriológico (Difco), plaqueando-se 50 µL em cada lado da placa. As placas foram vedadas e incubadas a 37 °C por 28 dias. Após este período, as colônias de micobactérias foram contadas com auxílio de lupa. O número de colônias foi corrigido de acordo com as diluições e peso dos pulmões e expresso em $\log_{10}$ do número de UFC/pulmão.

3.12. Análise histopatológica dos pulmões

O lóbulo superior direito dos pulmões dos animais foram removidos após 30 dias da infecção. Os tecidos foram fixados por 24 h em tampão de Millonig (10% formaldeído – Sigma ST. Louis, MO, USA; 1,86% de fosfato de potássio monobásico e 0,42% de hidróxido de sódio – Merck, Montreal, Canadá, pH=7,4). As amostras fixadas foram desidratadas em séries de etanol, xilol e incluídas em Paraplast Plus (McCormick). Cortes histológicos com 5 µm de espessura foram corados com hematoxilina – eosina (HE) e analisados quanto à manutenção da estrutura normal, presença e tipo de infiltrado celular e presença de áreas de necrose.

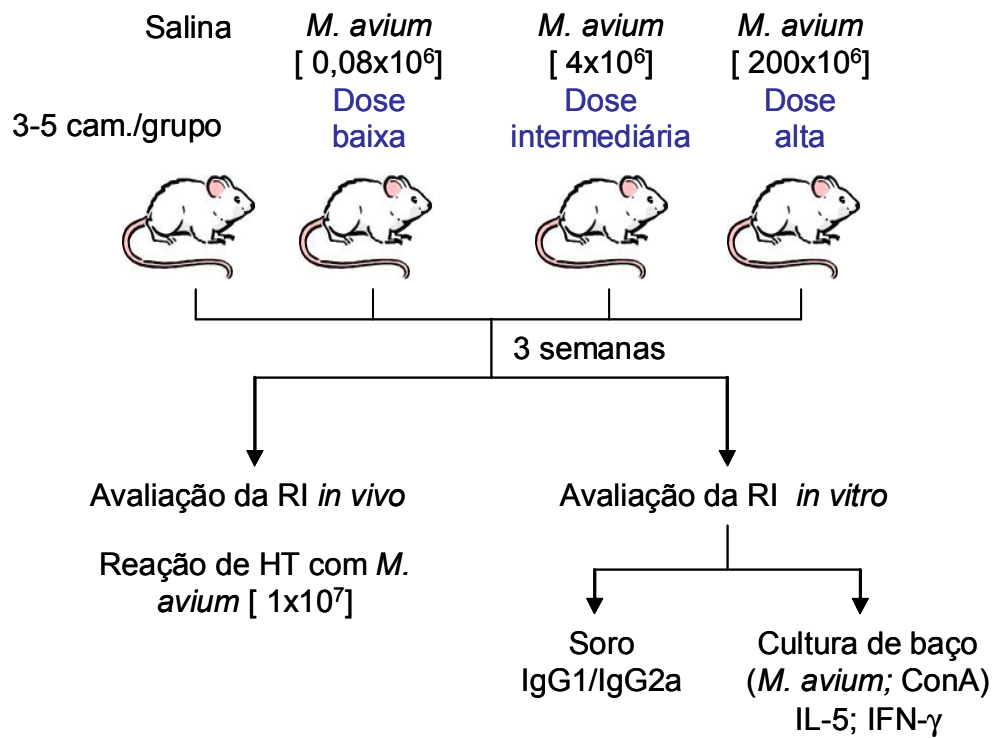
3.13. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados empregando-se o programa Graph Pad Software (San Diego, CA, USA, 1993). Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA), não paramétrica, por meio de comparações múltiplas pelo método de Kruskal-Wallis, seguida pelo teste de Dunn. Valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4. Protocolos Experimentais e Resultados

4.1. PROTOCOLO 1

AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DO *M. avium*



4.1.1. Reação de hipersensibilidade tardia e produção de anticorpos e citocinas

A resposta imune induzida pela inoculação de *M. avium* por via subcutânea, na base da cauda, foi inicialmente avaliada após inoculação de três concentrações distintas de inóculo: doses baixa, intermediária e alta, correspondentes a $0,08 \times 10^6$, 4×10^6 e 200×10^6 , respectivamente. O primeiro parâmetro da resposta imune celular analisado *in vivo* foi a reação de hipersensibilidade tardia no período de 72h após a inoculação de antígenos micobacterianos. Neste período foi observado aumento na espessura das patas (mm), nos animais imunizados com as doses intermediária e alta de *M. avium*. O aumento observado no grupo imunizado com dose alta apresentou reação de hipersensibilidade tardia significativa em relação aos grupos salina e dose baixa (figura 1). Os níveis de anticorpos anti-hsp65 nos animais imunizados com *M. avium* foram baixos e similares aos encontrados no grupo controle, o qual recebeu somente solução salina. Estes resultados são mostrados na figura 2 e se referem a IgG1 (figura 2a) e IgG2a (figura 2b).

A estimulação das culturas esplênicas com antígenos micobacterianos induziu produção significativa de IFN- γ nos animais previamente imunizados com doses intermediária e alta de *M. avium*. A produção de IFN- γ induzida por Con A foi menor nos grupos previamente imunizados em comparação com o grupo controle (figura 3).

Níveis elevados de IL-5 também foram detectados nas culturas provenientes dos animais imunizados com doses intermediária e alta de *M. avium* reestimuladas *in vitro* com o antígeno específico. A estimulação com Con A induziu produção de IL-5, mas os resultados foram similares nos 4 grupos experimentais (figura 4). Chama atenção o fato dos animais imunizados com doses intermediária e alta de *M. avium*, apresentarem produção endógena elevada em comparação com o grupo controle. Estas alterações observadas não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle, provavelmente devido ao número reduzido de animais testados.

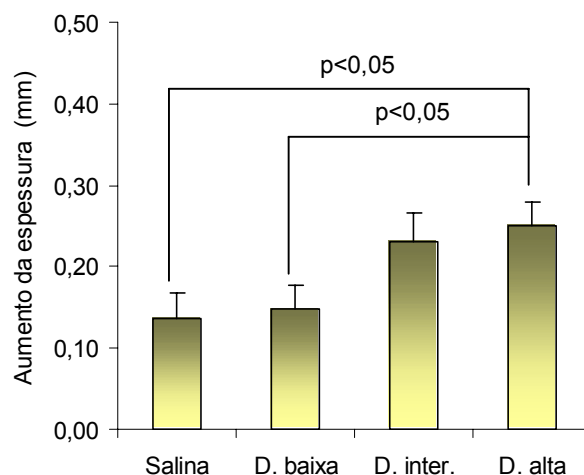


Figura 1 – Reação de hipersensibilidade tardia em camundongos BALB/c imunizados com *M. avium*. Os animais foram testados 21 dias após a imunização pela inoculação de 100 μ l da suspensão de 1×10^8 UFC de *M. avium*/mL no coxim plantar. A medida da espessura da pata foi realizada 72 h após o desafio. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de 5 animais.

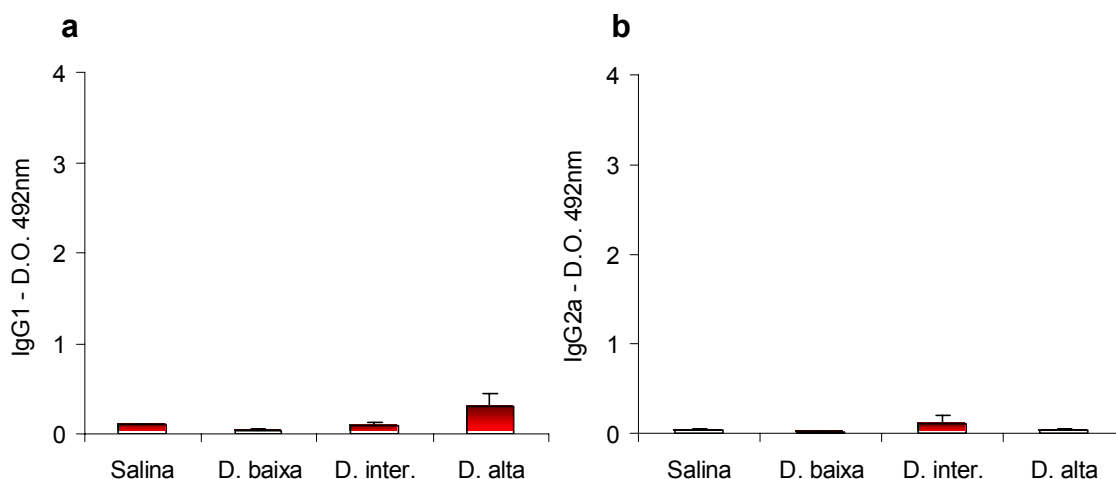


Figura 2 – Níveis séricos de anticorpos (IgG1 e IgG2a) anti-hsp65 em camundongos BALB/c imunizados com *M. avium*. As amostras de soro foram coletadas 3 semanas após a imunização e o nível de anticorpos foi determinado por ELISA após diluição 1:10 das amostras. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de 5 animais.

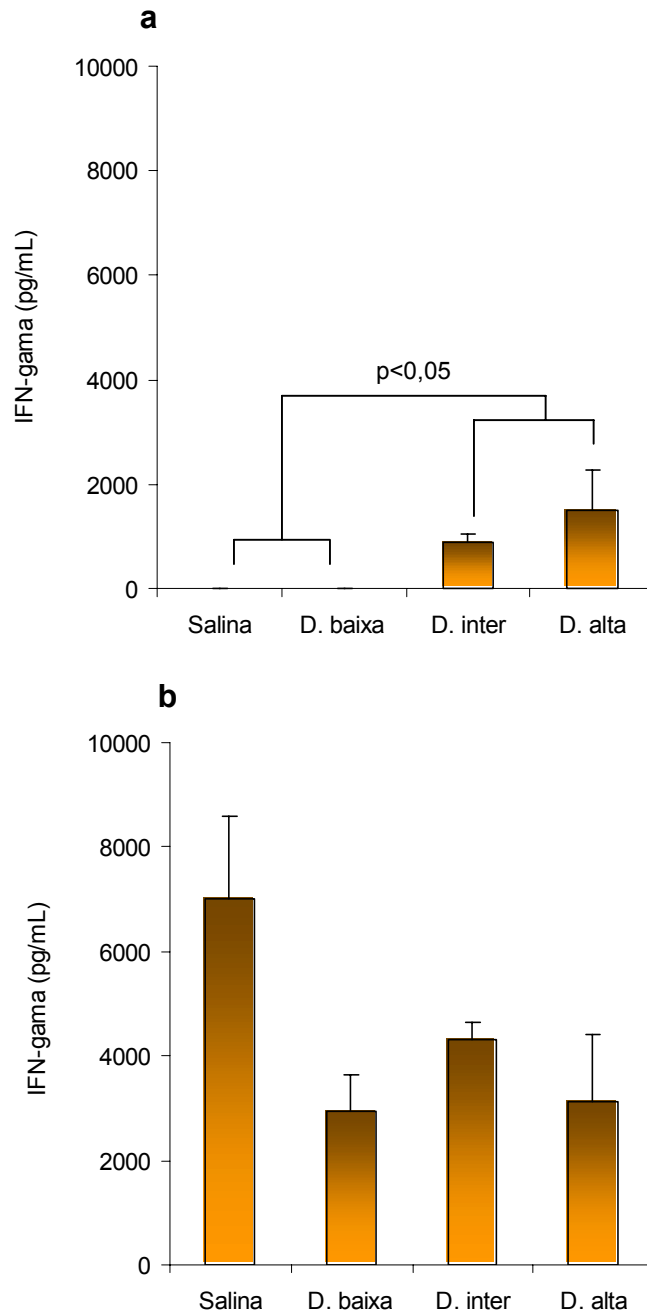


Figura 3 – Produção de IFN- γ por células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados com *M. avium*. Os níveis de IFN- γ em culturas estimuladas com *M. avium* ($1,2 \times 10^7$ UFC de *M. avium*/mL) (a) e em culturas estimuladas com ConA (10 μ g/mL) (b) foram determinados por ELISA em sobrenadantes coletados após 48 h de cultura. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de 3 animais.

Obs.: Níveis de IFN- γ nas culturas controle (não estimuladas com Ag. Mic. ou ConA) ficaram abaixo de 66 pg/mL, limite mínimo de detecção.

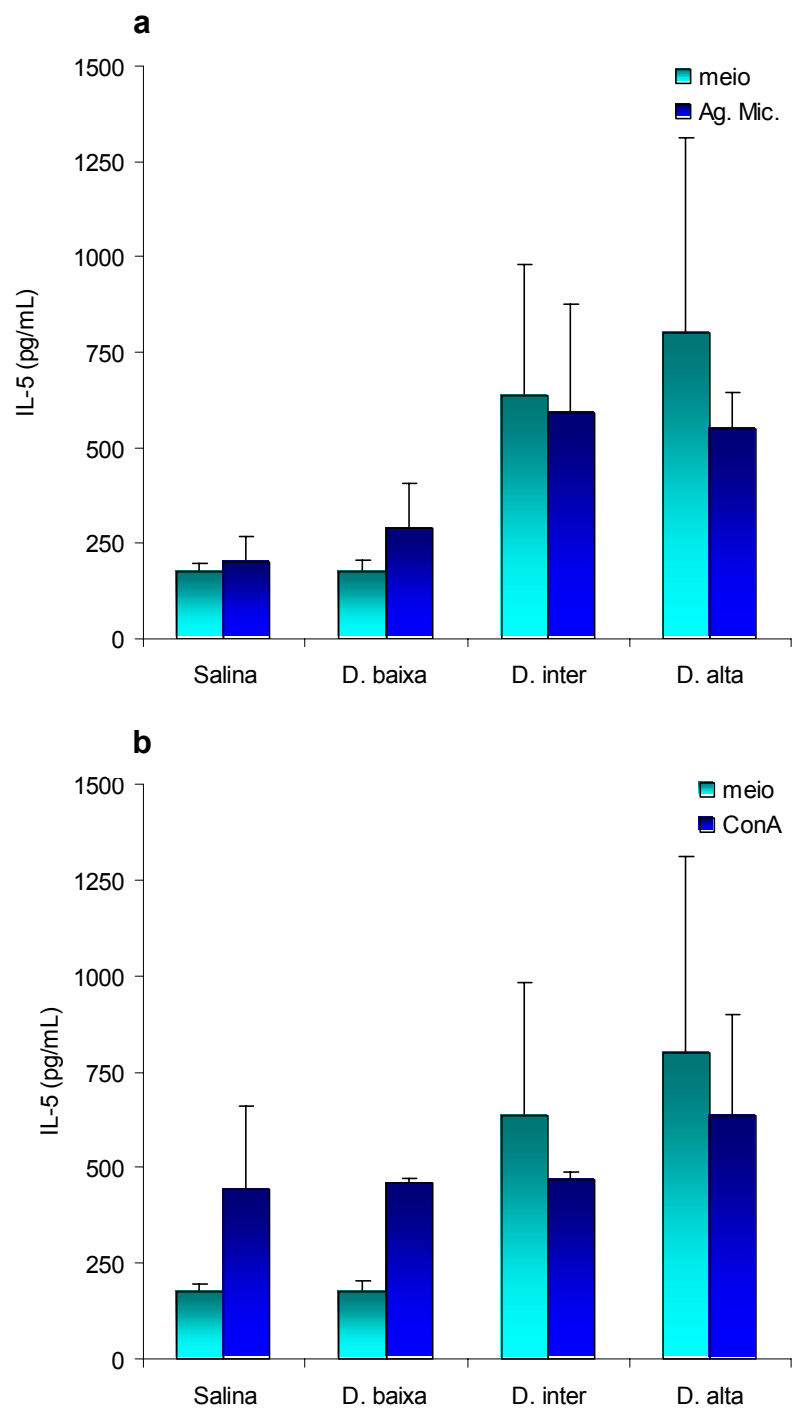
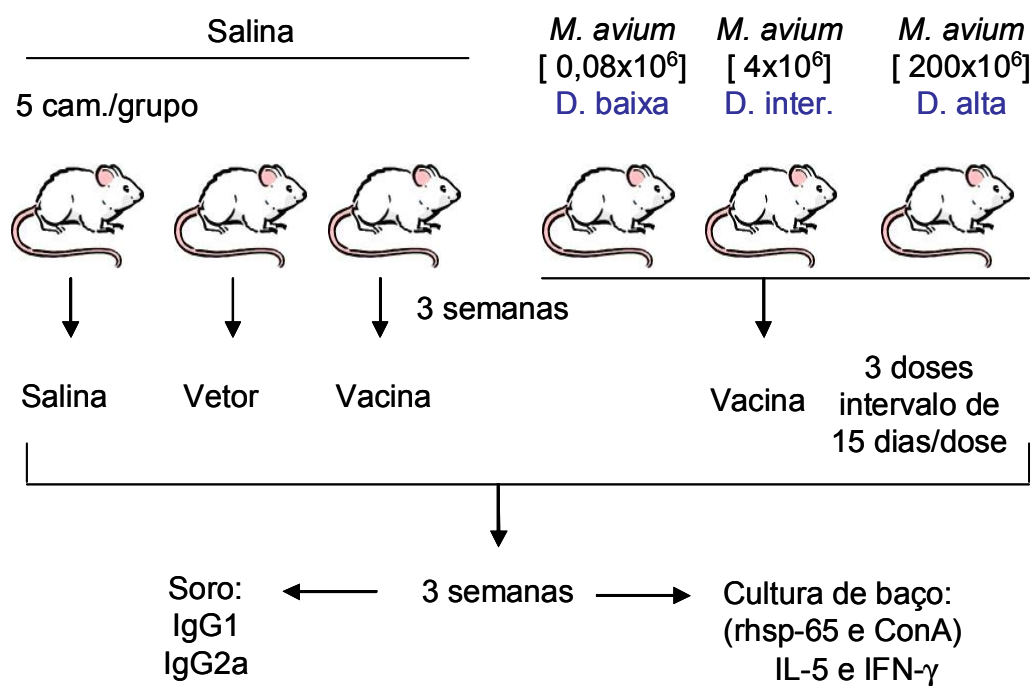


Figura 4 – Produção de IL-5 por células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados com *M. avium*. Os níveis de IL-5 em culturas estimuladas com *M. avium* ($1,2 \times 10^7$ UFC de *M. avium*/mL) (a) e em culturas estimuladas com ConA (10 µg/mL) (b) foram determinados por ELISA em sobrenadantes coletados após 48h de cultura. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. de 3 animais.

4.2. PROTOCOLO 2

EFEITO DO *M. avium* NA IMUNOGENICIDADE DA VACINA DNAhsp65



4.2.1. Produção de anticorpos e citocinas

Para a determinação do efeito da imunização prévia com *M. avium* na imunogenicidade da vacina DNAhsp65 foram utilizados seis grupos experimentais. Os três grupos controle foram injetados previamente com salina e posteriormente, com três doses de salina, vetor ou vacina. Os três grupos experimentais adicionais foram imunizados inicialmente com *M. avium* em três diferentes concentrações, seguido das três doses de vacina.

Três semanas após a administração da última dose foram avaliadas as respostas imunes humoral (IgG1 e IgG2a) e celular (IFN- γ e IL-5).

A produção de anticorpos em animais imunizados apenas com a vacina apresentou padrão misto caracterizado tanto pela produção de IgG1 quanto de IgG2a. A imunização prévia com *M. avium*, a qual foi seguida de três doses de vacina, primou para maior indução de anticorpos por DNAhsp65 (figura 5a e 5b). Este efeito foi estatisticamente significativo no grupo imunizado com a maior dose de *M. avium* e foi confirmado em experimento posterior (figura 6a e 6b). Para avaliar se esta modulação positiva do nível de anticorpos estava relacionada com possível *priming* para diferenciação Th1, calculamos, com os resultados mostrados na figura 6, a relação numérica entre as densidades ópticas correspondentes à quantificação de IgG2a e IgG1 em duas situações: nos animais só vacinados e nos animais primados com a dose mais elevada de *M. avium* seguida da vacina. Constatamos que não ocorreu alteração significativa da relação IgG2a/IgG1 nas duas situações (grupo vacina 0,87 e vacina + *M. avium*, 0,82). Quanto à produção de citocinas, o contato prévio com *M. avium* reduziu a produção de IFN- γ e aumentou a produção de IL-5 por células esplênicas estimuladas com rhsp65 em animais vacinados com DNAhsp65 (figura 7a e 7b). De forma semelhante, animais que foram submetidos ao contato prévio com *M. avium* e posteriormente vacinados com DNAhsp65 apresentaram redução na produção de IFN- γ e aumento na produção de IL-5 por células esplênicas estimuladas com ConA (figuras 8a e 8b). Chama atenção o fato dos animais imunizados com doses intermediária e alta de *M. avium* apresentarem elevada produção endógena de IL-5. Elevada produção de IFN- γ foi observada no grupo

controle inoculado com vetor, tanto nas culturas estimuladas com rhsp65 quanto com ConA.

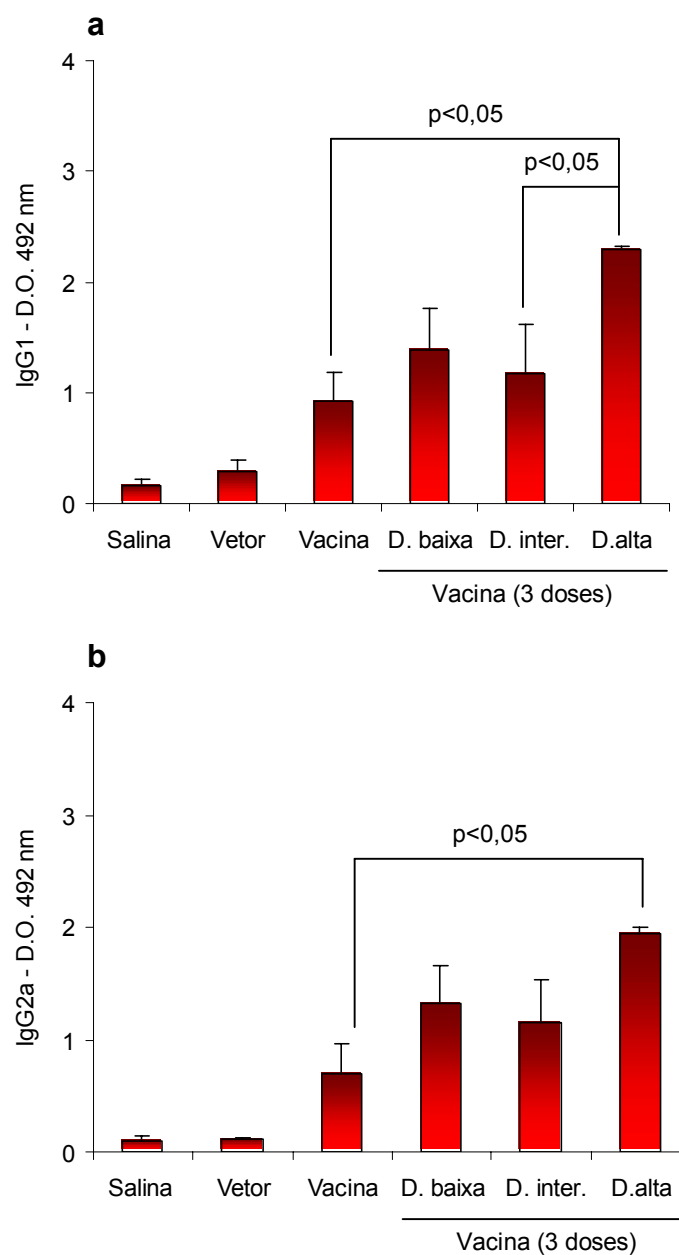


Figura 5 – Efeito de diferentes doses de *M. avium* sobre a produção de anticorpos induzida pela vacina DNAhsp65. As amostras de soro foram obtidas 15 dias após a 3ª imunização com a vacina DNAhsp65 (100 µg/dose) e o nível de anticorpos foi determinado por ELISA. Média da D.O. ± E.P.M. de 5-6 amostras testadas após diluição 1:10.

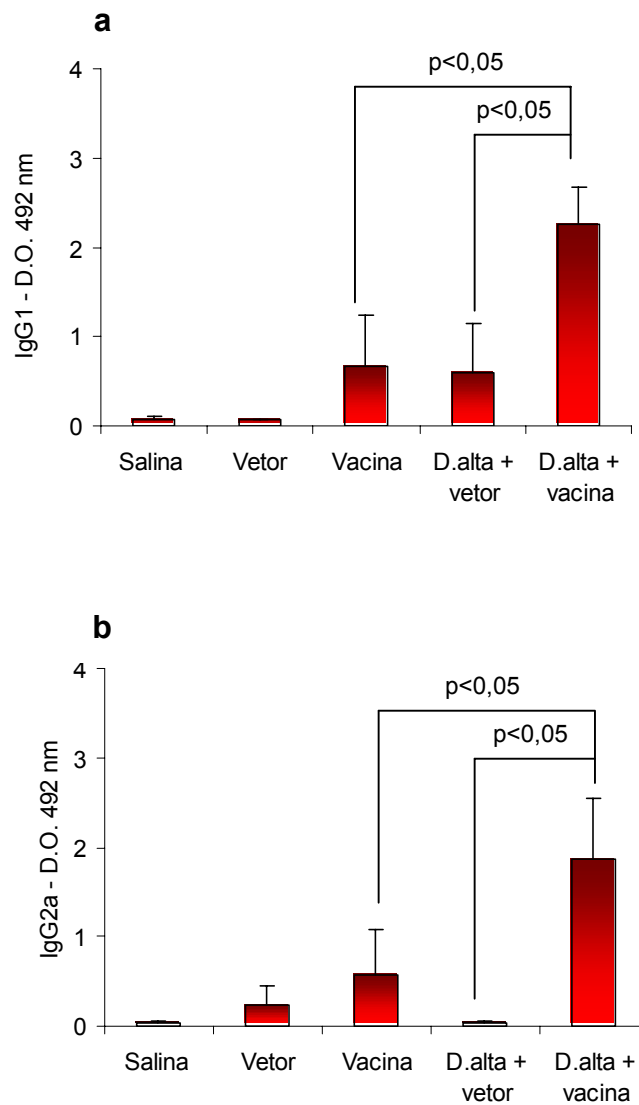


Figura 6 – Efeito de dose elevada de *M. avium* sobre a produção de anticorpos induzida pela vacina DNAhsp65. A concentração de anticorpos nas amostras de soro obtidas 15 dias após 3ª imunização com a vacina DNAhsp65 (100 µg/dose) foi determinada por ELISA. Média da D.O. ± E.P.M. de 5-6 amostras testadas após diluição 1:10.

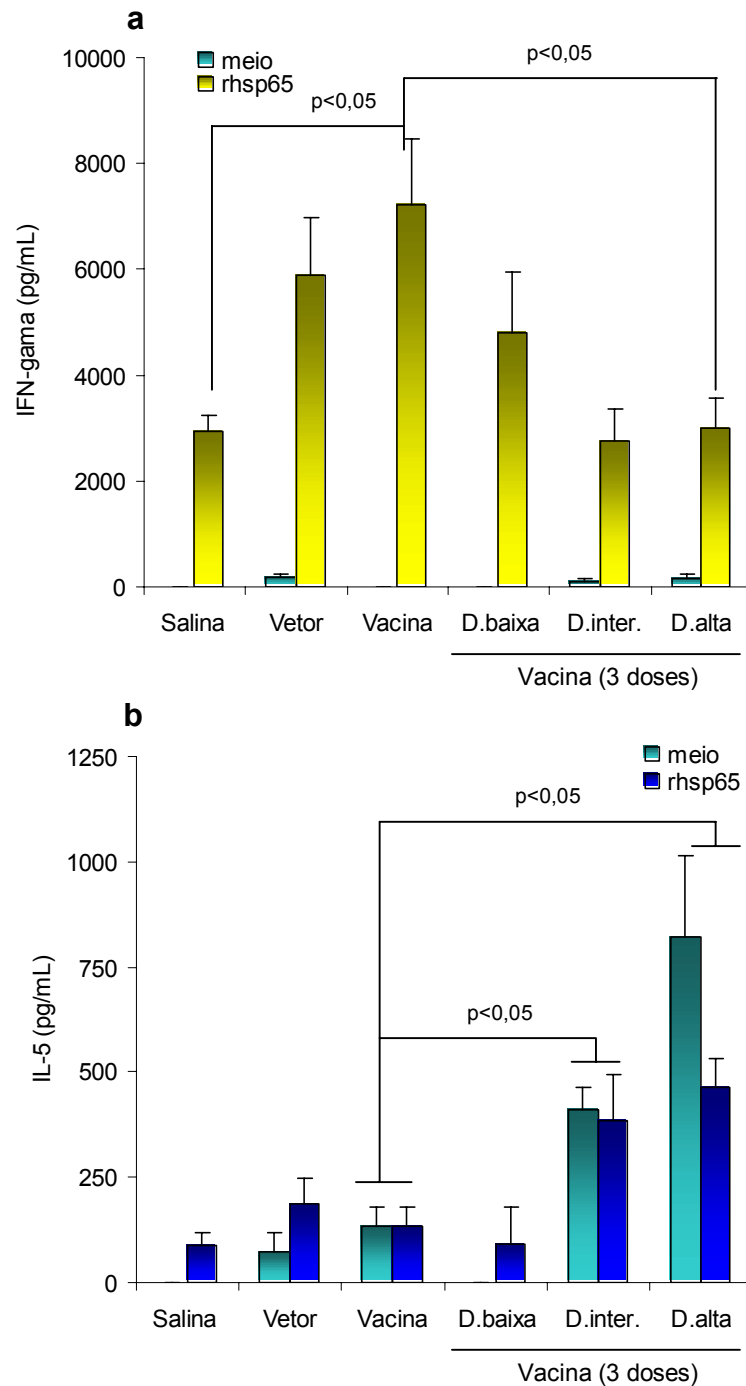


Figura 7 – Efeito de diferentes doses de *M. avium* sobre a produção de citocinas induzida pela vacina DNAhsp65. As culturas de esplenócitos foram estimuladas com rhsp65 (10 µg/mL) e os níveis de IFN-γ (a) e IL-5 (b) foram determinados por ELISA em sobrenadantes coletados após 48h de cultura. Média da D.O. ± E.P.M. de 5-6 animais.

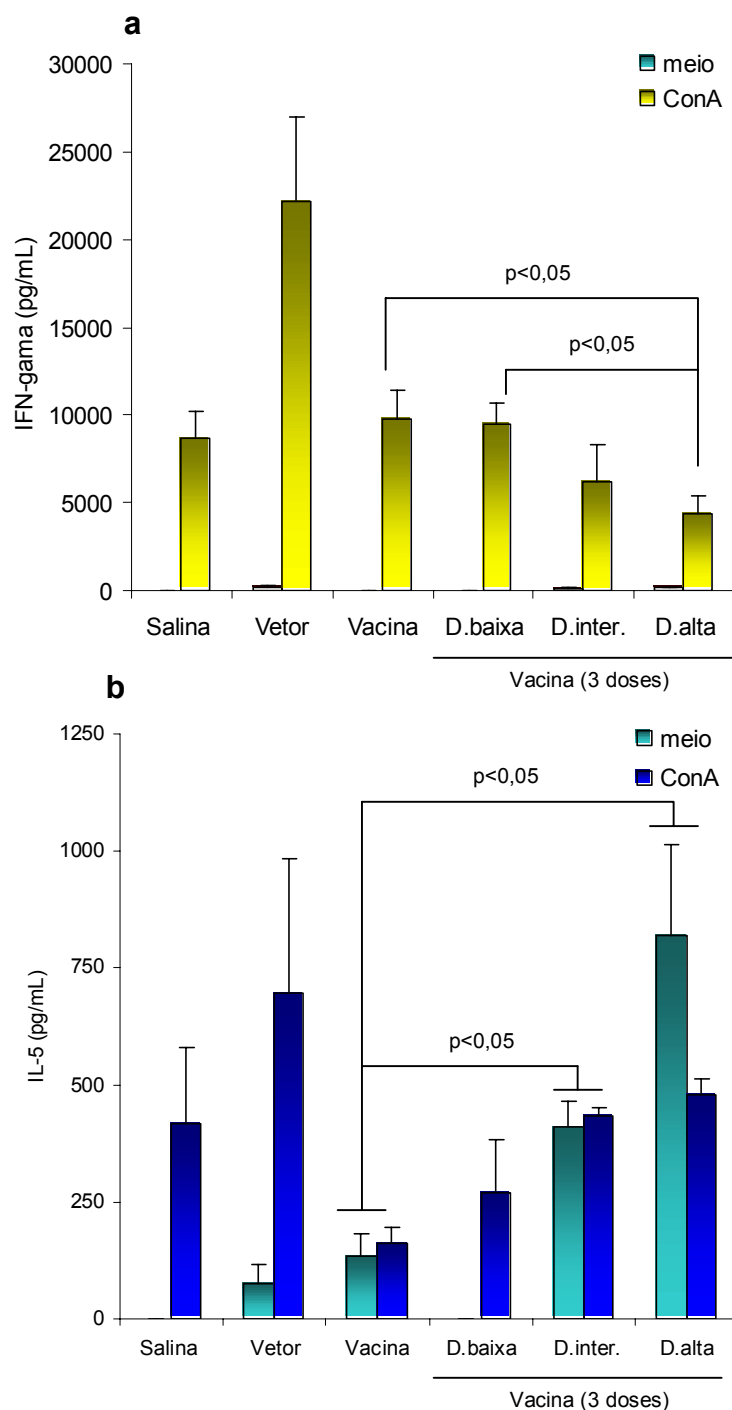
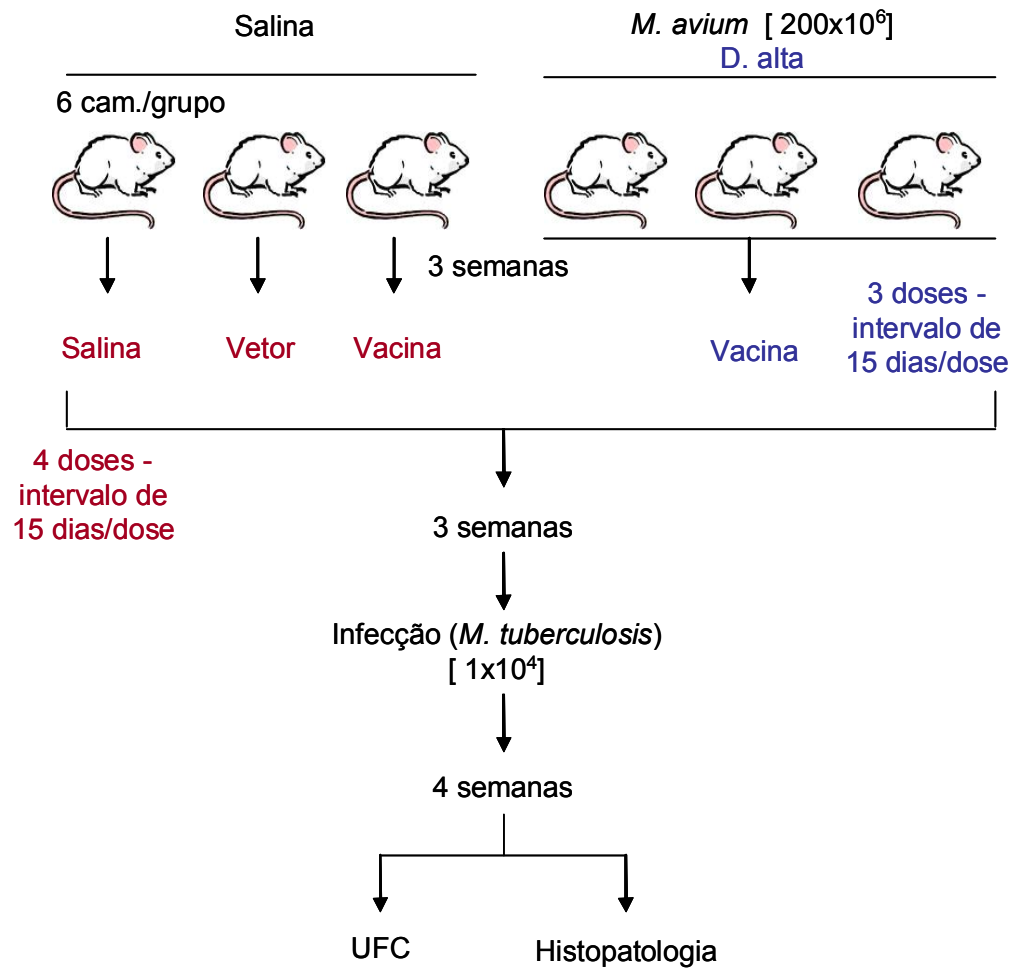


Figura 8 – Efeito de diferentes doses de *M. avium* sobre a produção de citocinas induzida pela vacina DNAhsp65. As culturas de esplenócitos foram estimuladas com ConA (10 µg/mL) e os níveis de IFN-γ (a) e IL-5 (b) foram determinados por ELISA em sobrenadantes coletados após 48h de cultura. Média da D.O. ± E.P.M. de 5-6 animais.

4.3. PROTOCOLO 3

EFEITO DO *M. avium* NA EFICÁCIA PROTETORA DA VACINA DNAhsp65



4.3.1. Determinação de carga bacteriana e análise histopatológica pulmonar

Em função da cinética de dose realizada nos protocolos anteriores que mostrou maior imunogenicidade das doses mais elevadas de *M. avium* optamos por realizar o protocolo que avaliou a eficácia protetora com animais imunizados com a dose mais alta de *M. avium* (200×10^6 UFC/animal).

Para avaliação do efeito do *M. avium* na eficácia protetora da vacina DNAhsp65 foram utilizados seis grupos experimentais. Os grupos controle foram injetados previamente com salina e posteriormente, com três doses de salina, vetor ou vacina. Os outros grupos foram imunizados inicialmente com *M. avium* (dose alta) e depois com três doses de salina, vetor ou vacina.

Decorridas três semanas após a última imunização, todos os grupos foram inoculados, via intratraqueal, com 1×10^4 UFC/0,1 mL de *M. tuberculosis*. Trinta dias depois da infecção os animais foram sacrificados e os pulmões coletados para determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) e análise histopatológica.

Utilizando como parâmetro a recuperação de bacilos viáveis do pulmão (UFCs) foi observado que a administração de 4 doses de DNAhsp65 ou a associação de *M. avium* com 3 doses de DNAhsp65 não reduziu o número de UFCs (figura 9). Contudo, a análise histopatológica comparativa dos pulmões dos grupos normal, infectado e DNAhsp65/infectado, mostrou preservação do parênquima pulmonar proporcionada pela vacinação com DNAhsp65 (4 doses) (quadro 1 e figura 10). Além disso, a análise comparativa dos grupos: infectado, DNAhsp65/infectado, *M. avium*/infectado e *M. avium*+DNAhsp65 (3 doses)/infectado, demonstrou que a sensibilização prévia com *M. avium* diminuiu o efeito de preservação do parênquima pulmonar pela vacina DNAhsp65 (quadro 2 e figura 11).

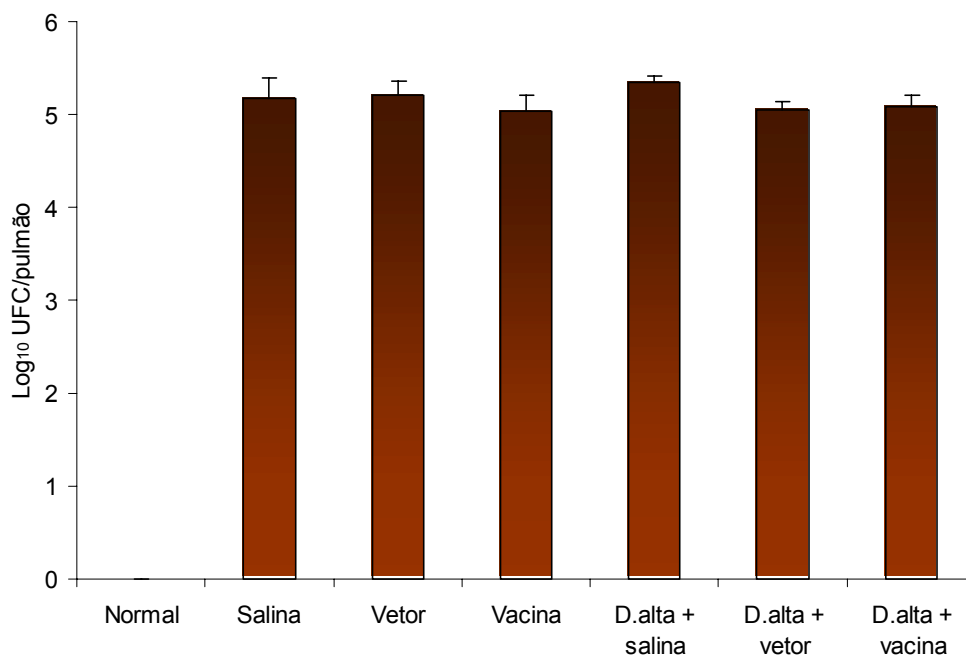


Figura 9 – Efeito da imunização prévia com *M. avium* na eficácia protetora (UFC no pulmão) da vacina DNAhsp65. Camundongos BALB/c primados com *M. avium* (200×10^6 UFC/animal) foram posteriormente imunizados com DNAhsp65. Grupos controles foram inoculados com salina, *M. avium*, vetor, ou vacina. Três semanas após a última dose de vacina os animais foram infectados com 1×10^4 UFC/0,1 mL de *M. tuberculosis* por via intratraqueal. Trinta dias após a infecção os animais foram avaliados quanto ao número de UFC no pulmão. Média $\pm$ E.P.M. de 6 animais.

Quadro 1 – Análise histopatológica pulmonar de animais imunizados com DNAhsp65 (4 doses) e desafiados com *M. tuberculosis*.

Figura 10 A	Normal	A estrutura pulmonar estava preservada sendo que brônquios, alvéolos pulmonares e vasos apresentavam aspecto normal.
Figura 10 B	Infectado	O parênquima pulmonar estava intensamente infiltrado apresentando acúmulo de células mononucleares ao redor dos vasos e brônquios e também áreas de necrose dispersas pelo interstício do órgão.
Figura 10 C	Imunizado (DNAhsp65) infectado	Presença de áreas preservadas de parênquima com estruturas alveolares semelhantes às de animais normais. Os infiltrados inflamatórios situados em regiões perivascular e peribronquial caracterizaram-se pela presença de células mononucleares.

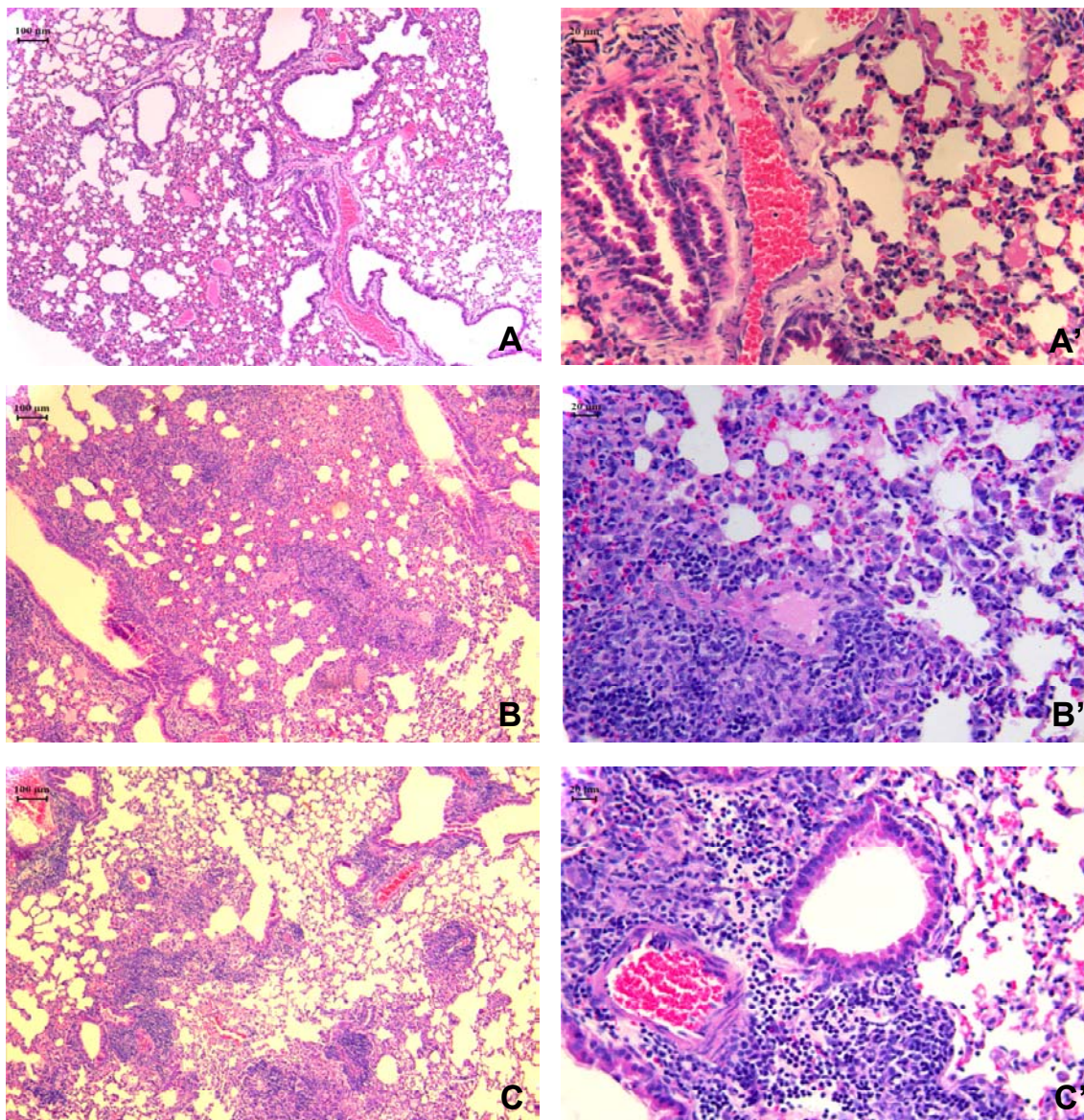


Figura 10 - Efeito da imunização com DNAhsp65 no parênquima pulmonar. Camundongos BALB/c foram imunizados com DNAhsp65 e os grupos controles inoculados com salina. Três semanas após a última dose de vacina ou salina os animais foram infectados com 1×10^4 UFC/0,1 mL de *M. tuberculosis* por via intratraqueal. Trinta dias após a infecção foi avaliada a histopatologia pulmonar. Na coluna da esquerda estão representadas as histopatologias dos grupos normal (A); salina/infectado (B) e vacina/infectado (C), aumento de 100x. Na coluna da direita estão representados os mesmos grupos (A', B' e C'), respectivamente. Fotomicrografias em aumento de 400x. Coloração: Hematoxilina-eosina (HE).

Quadro 2 – Análise histopatológica pulmonar de animais primados com *M. avium* e posteriormente imunizados com DNAhsp65 (3 doses) e desafiados com *M. tuberculosis*.

Figura 11 A	Infectado	O parênquima pulmonar estava intensamente infiltrado, apresentando acúmulo de células mononucleares ao redor dos vasos e brônquios e áreas de necrose dispersas pelo interstício do órgão.
Figura 11 B	Imunizado (DNAhsp65) infectado	Presença de áreas preservadas de parênquima com estruturas alveolares semelhantes às de animais normais. Os infiltrados inflamatórios, situados em regiões perivasculares e peribronquiais, caracterizaram-se pela presença de células mononucleares.
Figura 11 C	<i>M. avium</i> e infectado	O parênquima pulmonar apresentou-se intensamente infiltrado com acúmulo de células mononucleares ao redor dos vasos e brônquios, além de áreas de necrose, dispersas pelo interstício do órgão.
Figura 11 D	<i>M.avium</i> + DNAhsp65 e infectado	Desorganização evidente da arquitetura do parênquima pulmonar caracterizada por intensos infiltrados perivasculares e peribronquiais compostos por células mononucleares. Os alvéolos apresentaram-se comprometidos e as áreas de necrose, maiores que as observadas nos outros grupos, permearam todo o interstício pulmonar.

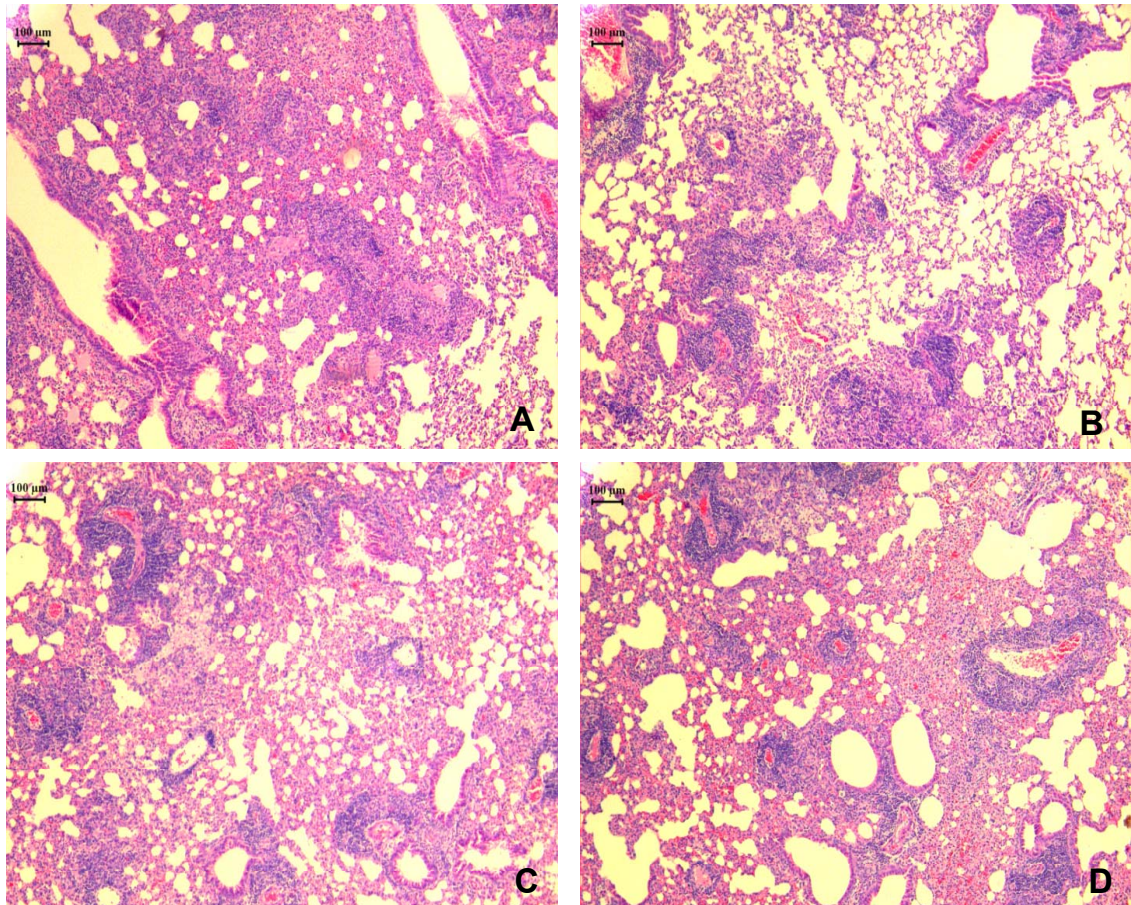


Figura 11 - Efeito da imunização prévia com *M. avium* na eficácia protetora (preservação do parênquima pulmonar) da vacina DNAhsp65. Camundongos BALB/c primados com *M. avium* (200×10^6 UFC/animal) foram posteriormente imunizados com DNAhsp65. Grupos controles foram inoculados com salina, *M. avium*, vetor, ou vacina. Três semanas após a última dose de vacina os animais foram infectados com 1×10^4 UFC/0,1 mL de *M. tuberculosis* por via intratraqueal. Trinta dias após a infecção foi avaliada a histopatologia pulmonar. Histopatologias dos grupos infectado (A), vacina/infectado (B), *M. avium* (dose alta) + salina/infectado (C) e *M. avium* (dose alta) + vacina/infectado (D). Fotomicrografias e aumento de 100x. Coloração: Hematoxilina-eosina (HE).

5. Discussão

O Brasil é um dos países com maior incidência de TB e segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan/MS), são notificados 85 mil casos novos de TB, anualmente. Assustadoramente ocorrem cerca de 6 mil óbitos por ano em decorrência desta doença (66).

Atualmente o BCG é a única preparação vacinal disponível para profilaxia desta infecção. Entretanto, segundo a OMS sua eficácia varia de 0 a 80%. Além disto, a eficácia da vacinação neonatal com BCG diminui no decurso da idade (67).

Tanto a eficácia variável quanto a queda na imunidade têm sido atribuídas, pelo menos parcialmente, ao efeito de micobactérias ambientais as quais modulariam negativamente esta resposta através de imunidade cruzada. Em função destas limitações do BCG se pesquisa uma nova vacina para tuberculose. Entre as vacinas candidatas se destaca a vacina gênica construída pela inserção do gene que codifica a hsp65 de *M. leprae* em vetores plasmídeos, pcDNA3 inicialmente e pVAX mais recentemente.

O objetivo geral desta investigação foi avaliar se antígenos micobacterianos ambientais podem, de forma similar ao que tem sido proposto para o BCG, afetar a imunogenicidade e a eficácia protetora desta nova vacina para TB. Neste trabalho utilizamos a construção pVAXhsp65, cujo plasmídeo vetor está aprovado para uso humano, pois contém o gene de resistência ao antibiótico kanamicina. A justificativa para esta investigação se encontra no fato de que o antígeno codificado por esta vacina (proteína de choque térmico de 65 KDa) está presente em várias micobactérias ambientais e mesmo em outros patógenos e poderia, por ser ubíqua, afetar de forma similar, a vacina DNAhsp65.

Em função desta premissa avaliamos o efeito da inoculação do *M. avium* nas características da resposta imune induzida por uma imunização posterior com DNAhsp65. Com este protocolo geral tínhamos em mente mimetizar uma situação possível na natureza, ou seja, o contato com micobactérias ambientais antes da imunização genética.

Iniciamos este trabalho avaliando se o *M. avium* induzia resposta imune. Para isto, diferentes doses da micobactéria inativada pelo calor foram inoculadas por via subcutânea. Este procedimento desencadeou resposta imune específica

constatada pela positividade da reação de hipersensibilidade tardia e pela produção de IFN- γ por esplenócitos reestimulados com o antígeno *in vitro* e pela produção endógena de IL-5 nos grupos imunizados com doses intermediária e alta de *M. avium*. A produção das citocinas, IFN- γ e IL-5, sugeriu a indução de uma resposta imune de padrão misto, ou seja, Th1/Th2. A produção de IFN- γ também foi avaliada após estímulo dos esplenócitos com Con A. Neste caso chamou a atenção o fato das células oriundas de animais previamente imunizados com *M. avium* ter produzido menor quantidade de IFN- γ . Não investigamos a origem deste fenômeno, mas é possível que tenha ocorrido morte celular associada com hiperativação destas células (68). Voltaremos a discutir este assunto, de forma mais detalhada, mais adiante.

A resposta imune humoral, a qual foi avaliada pelos níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-hsp65, mostrou ausência de anticorpos. Pensamos inicialmente que este resultado negativo se devesse ao fato do antígeno hsp65 não ser um antígeno imunodominante no *M. avium*. Esta possibilidade encontra algum suporte na literatura. Nagabhushanam *et al.* (69), ao avaliar em camundongos BALB/c inoculados com *M. avium* vivo concluíram que poucos clones de células T foram estimulados durante a infecção e que a hsp65 não é um antígeno imunodominante para células T nesse modelo. Estes autores justificam tais resultados relacionando-os à baixa disponibilidade da hsp65 a qual se encontra associada ao meio citoplasmático e parede celular da micobactéria. A possibilidade de que o protocolo empregado (uma única dose, administrada por via subcutânea, de micobactéria morta e sem adjuvante) tenha sido pouco imunogênico também não pode ser descartada. A determinação do nível de anticorpos para antígenos totais de *M. avium* teria sido, certamente, mais adequada.

Após a constatação de que o *M. avium* induzia resposta imune, avaliamos o efeito do *priming* com *M. avium* na resposta imune induzida pela vacina pVAXhsp65. Os resultados obtidos mostraram claramente que a inoculação prévia de *M. avium* afetou a imunogenicidade desta vacina gênica. Esta interferência foi observada tanto na produção de anticorpos quanto de citocinas; tendo se caracterizado por aumento de IgG1 e IgG2a séricas anti-hsp65 e por maior produção espontânea de IL-5 e menor de IFN- γ por esplenócitos estimulados *in*

vitro com rhsp65. Em conjunto estes resultados mostram que o contato prévio com *M. avium* modulou a resposta imune específica posteriormente induzida pela vacina gênica.

O efeito na produção de IgG1 e IgG2a anti-hsp65 foi bastante claro, tendo ocorrido uma modulação positiva na resposta imune humoral. Por outro lado, o efeito na produção de citocinas é mais difícil de entender e, portanto, de avaliar. A constatação de que o IFN- γ diminuiu e que a IL-5 aumentou tanto nas culturas estimuladas com rhsp65 quanto Con A, sugere a primeira vista, uma estimulação preferencial de Th2. Entretanto, esta possibilidade não combina com a constatação de que os dois isotipos de IgG (IgG1 e IgG2a) foram igualmente induzidos. A produção de anticorpos IgG2a que tem propriedade opsonizante, é entendida na literatura, como um anticorpo indicador de ativação Th1 (70). Uma possibilidade é que esta menor produção de IFN- γ se deva a um fenômeno de apoptose que estaria ocorrendo, *in vitro* ou *in vivo*, com as células Th1 produtoras de IFN- γ . Este fenômeno conhecido como morte celular por excesso de ativação desencadeia apoptose mediada por interação Fas-FasL (71,68). Além disso, tem sido descrito que células Th1 são mais propensas a apoptose do que células Th2 (68).

Uma comparação direta com a literatura é dificultada pela inexistência de protocolos similares ao utilizado neste trabalho. Apesar de mais de 200 vacinas estarem sendo testadas atualmente, empregando outros antígenos micobacterianos, tais como Ag85A e 85B, APA, CFP10, MTP64, ESAT-6, Hsp60, 65 e 70 KDa, proteína R8307, antígeno micobacteriano rico em prolina 36 KDa, 19 KDa e proteína 45 KDa e as resultantes de proteína de fusão, Mtb32/Mtb39 ('Mtb72F') produzida pela Corixa Inc./ Glaxo Smith Kline e a ESAT-6/Ag85B desenvolvida pelo Statens Serum Institute de Copenhagen (43,45,46,47,72), em poucos destes trabalhos tem sido investigada uma possível interferência de micobactérias ambientais. Um trabalho que se assemelha à abordagem feita por nós foi realizado por Brandt *et al.* (29). Neste caso, além de ser avaliada a interferência de micobactérias ambientais no BCG, foram feitos experimentos paralelos com vacinas de subunidades (Ag85B e ESAT-6), a fim de estabelecer comparações. Diferente do BCG, as vacinas de subunidades não foram afetadas

no contexto de proteção (dados de UFC), entretanto poucas informações desse protocolo foram apresentadas.

Além disto, uma comparação direta com o efeito de micobactérias ambientais sobre o BCG também é dificultada, pois a eficácia desta vacina parece se dever, em grande parte, à sua multiplicação e conseqüente indução de resposta imune (29). Tem sido sugerido que as micobactérias ambientais exercem efeito deletério sobre o BCG (73,74), justamente por bloquearem esta multiplicação inicial (75). Um efeito similar não seria esperado em vacinas gênicas.

A possibilidade de que o contato prévio com o *M. avium* esteja propiciando um microambiente que permita a diferenciação preferencial de células Th2 encontra respaldo na literatura.

Hernandez-Pando *et al.* (33), relataram que a imunização de camundongos BALB/c previamente imunizados com *M. vaccae* (10^7 e 10^9), via subcutânea, constataram que animais inoculados com a dose elevada (10^9 CFU) e posteriormente, desafiados com *M. tuberculosis*, induziu resposta mista, Th1 + Th2, que conduziu ao aumento da susceptibilidade à doença, se comparado a controles não imunizados, com rápida indução de pneumonia e alteração da predominância de resposta imune Th1 para Th2 (IL-2/IL-4) e correlação com o aumento da expressão de RNA mensageiro de TNF- α . Em função desses resultados, concluíram que a reatividade cruzada proveniente de antígeno micobacteriano pode desencadear resposta imune protetora ou aumento da susceptibilidade ao *M. tuberculosis*, como resultado da associação de padrão Th2 com TNF- α .

Nossos resultados mostram de forma evidente que a produção de IL-5 estava significativamente elevada em animais primados com as doses intermediária e alta de *M. avium*. Chama atenção o fato desta elevada produção ser espontânea, ou seja, ser independente de estímulo *in vitro* com rhsp65 ou Con A. No nosso entender esta produção de IL-5 sugere diferenciação Th2, embora a literatura tenha classicamente descrito a IL-4 como a citocina indicadora de Th2 (76,77). Em poucos experimentos detectamos níveis mais elevados de IL-4 em animais imunizados com *M. avium*, comparativamente com animais normais ou imunizados com DNAhsp65 (resultados não mostrados).

Talvez essa modulação da resposta imune, no sentido Th2, possa estar relacionada ao tipo de componente estrutural presente em micobactérias. Estudos recentes indicaram que lipídeos ou lipoproteínas da parede celular de *M. tuberculosis*, cepa Beijing, em comparação com cepas de *M. tuberculosis* de menor virulência, podem induzir maior produção de IL-4 e IL-13 por células humanas (78,79,80).

Também é atrativa a possibilidade de que este efeito modulador do *M. avium* seja dependente de dose. Esta possibilidade é reforçada por alguns dos nossos resultados. Por exemplo, observamos que o efeito modulador positivo do *M. avium* sobre produção de anticorpos foi maior na concentração mais elevada desta micobactéria. Também foi na concentração mais elevada que ocorreu maior produção de IL-5 e menor produção de IFN- γ . Realmente, dados da literatura mostram que a dose de micobactéria usada para imunização determina a natureza da resposta imune Th1/Th2. Enquanto baixas doses conduzem a uma resposta exclusivamente mediada por células (resposta Th1), altas doses geralmente desencadeiam resposta mista Th1/Th2 (81,82,83). O mecanismo imunológico envolvido nestas respostas parece dever-se a diferenças quantitativas de ocupação do TCR pelo complexo MHC-antígeno. Isto parece gerar diferenças qualitativas na transdução de sinal durante a ativação, resultando na produção maior de um fenótipo do que outro (84).

Tendo demonstrado que o *M. avium* afetava a imunogenicidade, na etapa seguinte investigamos se esta alteração era acompanhada por mudança na capacidade protetora da vacina pVAXhsp65.

Estudos preliminares com três doses de DNA (100 μ g cada) de pVAXhsp65 mostraram que esta nova preparação não diminuía o número de UFC no pulmão (85). Por isto neste trabalho utilizamos um esquema vacinal com quatro doses da vacina. Apesar deste protocolo também não ter diminuído o número de UFCs no pulmão, o mesmo foi claramente capaz de preservar o parênquima pulmonar, tendo a inflamação se restringido às regiões perivasculares e peribrônquicas. Este foi um dos resultados que consideramos bastante relevante neste trabalho. Este efeito protetor da vacina gênica para tuberculose foi descrito anteriormente por Bonato *et al.* (62), empregando o vetor pcDNA₃ na construção vacinal

(pcDNA₃hsp65) em um protocolo terapêutico. Segundo os autores o mecanismo envolvido nesta proteção foi relacionado à intensa ativação da resposta imune celular caracterizada pela recuperação da produção dos níveis de IFN- γ e TNF- α , com regulação positiva de CD18, CD28 e CD95 de células TCD8⁺, que nos pulmões contribuíram para redução da carga bacteriana e lesão pulmonar.

Resultados similares de proteção da estrutura pulmonar foram descritos por Basaraba *et al.* (86), que em protocolo de imunoterapia, utilizaram cobaias previamente infectadas com *M. tuberculosis* e, posteriormente, imunizadas com uma única dose de BCG. A histopatologia dos pulmões desses animais foi caracterizada por infiltrados celulares peribronquiais, peribronquiolares e perivasculares envolvidos por parênquima normal, enquanto que animais submetidos a três imunizações com BCG apresentaram substituição tecidual de parênquima pulmonar por tecido conectivo fibroso e pequenos focos de necrose.

É possível que o mecanismo envolvido na preservação da estrutura pulmonar observada nos animais que receberam a vacina DNAhsp65 possa estar relacionado com redução de apoptose dos macrófagos alveolares. Zhang *et al.* (87) demonstraram correlação inversa entre a expressão de hsp65 e porcentagem de apoptose em macrófagos oriundos de camundongos infectados com *Plasmodium yoelii*. Desta forma, sugeriram que a hsp65 possa ter contribuído para a imunidade protetora, prevenindo a apoptose de macrófagos. Descrição semelhante foi feita por Polla *et al.* (88), ao utilizar *Toxoplasma gondii* como modelo de infecção.

Embora tenhamos utilizado uma estratégia diferente (*M. avium* + pVaxhsp65), nossos resultados foram similares aos descrito por Skinner *et al.* (89), que em modelo de profilaxia, utilizaram marsupiais (*Trichosurus vulpecula*), e demonstraram que a associação de *M. vaccae* (inativado e em baixa dose) com BCG foi eficiente em proteção da estrutura pulmonar. Entretanto, tal associação não resultou na redução de UFC nos pulmões mesmo quando essa associação foi feita empregando doses maiores de *M. vaccae*. Resultados da análise histopatológica demonstraram que as lesões pulmonares nos animais do grupo vacinado foram caracterizadas por extensas áreas de necrose do parênquima pulmonar. Por outro lado, animais vacinados com BCG apresentaram menos

necrose e o grupo imunizado com *M. vaccae* e BCG apresentou número menor de animais com lesões pulmonares, quando comparado aos demais grupos.

Em nosso estudo, este efeito protetor no parênquima foi, entretanto, bloqueado pela imunização prévia com *M. avium*. Estes animais, nos quais a carga bacteriana se manteve inalterada no pulmão, apresentaram desorganização evidente do parênquima pulmonar, caracterizada por infiltrados mononucleares perivasculares e peribronquiais e também por áreas mais extensas de necrose. Consideramos este achado o mais relevante deste trabalho, pois o mesmo abre várias frentes de investigação e discussão de interesse prático na profilaxia da tuberculose. Se este efeito deletério do *M. avium* (ou outra micobactéria ambiental qualquer) for comprovado também em seres humanos, este fato obviamente constituirá um obstáculo para uso desta vacina. Por outro lado, a caracterização do mecanismo imunológico envolvido nesta interferência poderá esclarecer o efeito das micobactérias ambientais no BCG.

Este efeito do *M. avium* no parênquima foi semelhante ao encontrado por Basaraba *et al.* (89), que ao imunizarem cobaias com três doses de BCG. Os autores constataram substituição do parênquima pulmonar por tecido fibroso com poucos e pequenos focos de necrose. Esta resposta inflamatória patológica em cobaias foi relacionada, por esses pesquisadores à resposta imune exacerbada. Tais observações remetem à clássica Reação de Koch, observada em camundongos inoculados perifericamente com antígeno micobacteriano apresentaram inflamação pulmonar aguda e morte (90). Embora não tenhamos registrado mortes entre os animais desafiados com *M. tuberculosis*, os dados da análise histopatológica corroboram com a descrição acima e podem estar associados a uma maior estimulação do sistema imune a qual submetemos os animais (*priming* com *M. avium* + DNA_{hsp65} + infecção *M. tuberculosis*).

Estas observações também assemelham-se às encontradas por Turner *et al.* (91), que ao avaliarem as propriedades imunoterapêuticas de vacinas anti-TB, constataram que o BCG administrado após o desafio não somente foi ineficaz mas também desencadeou alterações patológicas nos pulmões. Os autores sugeriram inicialmente que o BCG tivesse reforçado a imunidade induzida pela infecção pelo *M. tuberculosis*, o que teria causado dano tecidual, devido à atração de fagócitos.

A segunda possibilidade seria a de que o reforço da resposta pelo BCG teria contra regulado ou subvertido a organização do granuloma.

O mecanismo imunológico pelo qual a micobactéria ambiental diminuiu o efeito protetor da vacina de DNAhsp65 no parênquima pulmonar certamente está relacionado com alterações imunológicas causadas pela inoculação prévia de *M. avium*. Neste sentido gostaríamos de especular uma possível contribuição de células T reguladoras. Atualmente tem sido sugerido que micobactérias ambientais, por serem potentes indutoras de células T reguladoras (Treg), possam controlar respostas tipo Th1 e Th2 (92). Este é um aspecto importante que tem sido notado em testes cutâneos em resposta ao BCG ou pelo contato recente com *M. tuberculosis*, que é diminuído em países em desenvolvimento onde micobactérias ambientais são abundantes (93,94). Em 2004 foi proposta a hipótese de que a excessiva atividade imunorregulatória de alguns pacientes suprimia a resposta protetora. Alguns pacientes com altos níveis de IL-10 eram essencialmente anérgicos. Isto sugeria a atividade excessiva de células Tregs (95). Entretanto, a maioria dos pacientes não anérgicos tinha resposta necrosante, originalmente definida por Robert Koch em cobaias e subsequente observada no homem (96). Isto sugeriu que a atividade relativa da via regulatória é variável na TB, mas independentemente desta atividade ser alta ou baixa, o paciente tem a doença. As atividades das células Tregs poderiam, portanto, não ser fator crucial. Provavelmente, o *M. tuberculosis* patogênico não falhava na indução de uma resposta Th1 ou causar a baixa regulação desta resposta, mas por “deliberadamente corromper” a resposta Th1, por meio de favorecimento do fenótipo Th2 (95). Isto tem sido correlacionado ao *background* de resposta Th2 resultante de alguns componentes de *M. tuberculosis* em humanos (97) e também em modelos experimentais (98). Essa hipótese foi claramente demonstrada em amostras de sangue de malawianos, nos quais o PPD induziu liberação de IL-5, quando comparado às amostras do Reino Unido (Dockrell, H. comunicação pessoal). Além disso, a vacinação com BCG falhou em baixar a produção de IL-5 (Dockrell, H. comunicação pessoal). Acredita-se também que humanos com um significativo *background* Th2 anti-*M. tuberculosis*, associado à liberação de antígenos durante a terapia, conduza ao fenômeno de Koch sistêmico mediado

por IL-4 e TNF α (99,100). Desse modo, acreditamos que uma possível interação sinérgica de citocinas (Th2 + TNF α) possa ter ocorrido no microambiente pulmonar, e que este efeito foi potencializado pelo contato prévio com *M. avium* e posteriormente pelo *M. tuberculosis*, o que resultou em maior efeito deletério na estrutura do parênquima pulmonar. Dosagens de TNF α nos homogenatos pulmonares destes animais poderão validar esta hipótese.

No seu conjunto, os resultados obtidos neste trabalho apontam para um possível efeito deletério de micobactérias ambientais na eficácia da vacina DNAhsp65. Este efeito, que talvez se deva ao estabelecimento de um micorambiente Th2, deverá ser considerado nos procedimentos de imunização em que a DNAhsp65 seja utilizada como vacina para tuberculose.

6. Conclusões

- A sensibilização prévia com *M. avium* (via subcutânea) contribuiu para o aumento da imunogenicidade da vacina DNAhsp65, mas não foi eficaz na redução do número de UFCs.
- DNAhsp65 (4 doses) não foi eficaz na redução do número de UFCs, mas protegeu parcialmente o parênquima pulmonar.
- A inoculação prévia com *M. avium* diminuiu o efeito protetor da vacina DNAhsp65 sobre o parênquima pulmonar.

7. Referências Bibliográficas

1. Donoghue HD, Spigelman M, Greenblatt CL, Lev-Maor G, Bar-Gal GK, Matheson C. *et al.* Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 584-92.
2. Wilson, L.G. The historical decline of tuberculosis in Europe and America: its causes and significance. *J Hist Med Allied Sci*, 1990, 45: 366-96.
3. Pablos-Mendez A, Sterling TR, Frieden TR. The relationship between delayed or incomplete treatment and all-cause mortality in patients with tuberculosis. *JAMA* 1996; 276:1223-28.
4. Cayla JA, Caminero JA, Rey R, Lara N, Valles X, Galdos-Tanguis H, *et al.* Current status of treatment completion and fatality among tuberculosis patients in Spain. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8: 458-64.
5. WHO. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. World Health Organization, Geneva, Switzerland, Report 2002.
6. WHO. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. World Health Organization, Geneva, Switzerland, Report 2005.
7. Bloom BR & Murray JL. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* 1992; 257: 1055-64.
8. WHO. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: Third global report/ the WHO/ IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance. World Health Organization, Geneva, Switzerland, Surveillance, 1999-2002.
9. Meacci F, Orru G, Iona E, Giannoni F, Piersimoni C, Pozzi G *et al.* Drug resistance evolution of a *Mycobacterium tuberculosis* strain from a noncompliant patient. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3114-20.
10. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne, BA. Resposta imune às doenças infecciosas. In: Kuby Immunology. New York: W. H. Freeman and Company; 2000. p.425-48.
11. Silva CL, Bonato VL, Lima KM, Coelho-Castelo AA, Faccioli LH, Sartori A, *et al.* Cytotoxic T cells and mycobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 2001; 197: 11-18.
12. MacGregor RR, Boyer JD, Ugen KE, Lacy KE, Gluckman SJ, Bagarazzi ML, *et al.* First humans trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. *J Infect Dis* 1998; 178: 92-100.

Referências bibliográficas segundo estilo dos Requisitos Uniformes para Originais submetidos a Revistas Biomédicas (estilo Vancouver) elaborado pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (ICMJE). *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47.

13. Kaufmann SHE. Immune response to tuberculosis: experimental animal models. *Tuberculosis* 2003; 83: 107-11.
14. Liu MA. DNA vaccines: a review. *J Int Med* 2003; 253: 402-10.
15. Porcelli S, Morita CT, Brenner MB. CD1b restricts the response of human CD4-8-T lymphocytes to a microbial antigen. *Nature* 1992; 360: 593-97.
16. Kaufmann SHE. Is the development of a new tuberculosis vaccine possible? *Nat Med* 2000; 6: 955-60.
17. Sakula A. BCG: who were Calmette and Guérin? *Thorax* 1983; 38: 806-12.
18. Sterne JA, Rodrigues LC, Guedes IN. Does the efficacy of BCG decline with time since vaccination? *Inf J Tuberc Lung Dis* 1998; 2: 200-07.
19. Colditz GA, Berkey CS, Mosteller F, Brewer TF, Wilson ME, Burdick E, *et al*. The efficacy of bacillus Calmette-Guerin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis: meta-analyses of the published literature. *Pediatrics* 1995; 96: 29-35.
20. Rodrigues LC, Diwan VK, Wheeler JG. Protective effect of BCG against tuberculous meningitis and millitary tuberculosis: a meta-analysis. *Int J Epidemiol* 1993; 22: 1154-58.
21. Fine PE. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* 1995; 346: 1339-45.
22. Karonga Prevention Trial Group. Randomised controlled trial of single BCG, repeated BCG, or combined BCG and killed *Mycobacterium leprae* vaccine for prevention of leprosy and tuberculosis in Malawi. *Lancet* 1996; 348: 17-24.
23. WHO. News and activities. *Bull OMS* 1995; 73: 805-07.
24. Tuberculosis Research Centre (ICMR), Chennai. Fifteen-year follow-up of trial of BCG vaccines in south India for tuberculosis prevention. *Indian J Med Res* 1999; 110: 56-69.
25. Bher MA. BCG-different strains, different vaccines? *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 86-92.
26. Bher MA & Small PM. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine* 1999; 17: 915-22.
27. Bher MA & Small PM. Has BCG attenuated to impotence? *Nature* 1997; 389: 133 -34.

28. Hess J. & Kaufmann SHE. Live antigen carriers as tolls for improved anti-tuberculosis vaccines. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 23: 165-73.
29. Brandt L, Feino Cunha J, Weinreich Olsen A, Chilima B, Hirsch P, Appelberg R, *et al.* Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infect Immun* 2002; 70: 672-78.
30. Palmer CE. & Long MW. Effects of infection with atypical mycobacteria on BCG vaccination and tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1966; 94: 553-68.
31. Orme IM & Collins FM. Efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG vaccination in mice undergoing prior pulmonary infection with atypical micobacteria. *Infect Immun* 1984; 44: 28-32.
32. Brown CA, Brown IN, Swinburne S. The effect of oral *Mycobacterium vaccae* on subsequent responses of mice to BCG sensitization. *Tubercle* 1985; 66: 251-60.
33. Hernandez-Pando R, Pavon L, Arriaga K, Orozco H, Madrid-Marina V, Rook G. Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high dose of a environmental mycobacteria saprophyte before infection. *Infect Immun* 1997; 65: 3317-27.
34. Edwards LB, Acquaviva FA, Livesay VT, Cross FW, Palmer CE. An atlas of sensitivity to tuberculin, PPD-B, and histoplasmin in the United States. *Am Rev Respir Dis* 1969; 99: 1-132.
35. British Toracic Association. Effectiveness of BCG vaccination in Great Britain in 1978. *Br J Dis Chest* 1980; 74: 215-27.
36. Fine PEM & Vynnycky E. The effect of heterologous immunity upon the apparent efficacy of (e.g.BCG) vaccines. *Vaccine* 1998; 16: 1923-28.
37. Tuberculosis Prevention Trial Madras. Trial of BCG vaccines in South India for tuberculosis prevention. *Indian J Med Res* 1980; 72: 1-74.
38. Andersen P. TB vaccines: progress and problems. *Trends Immunol* 2001; 22: 160-68.
39. Roberts AD, Sonnenberg MG, Ordway DJ, Furney SK, Brennan PJ, Belisle JT, *et al.* Characteristics of protective immunity engendered by vaccination of mice with purified culture filtrate protein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology* 1995; 85: 502-08.
40. Skeiky YA, Alderson MR, Ovendale PJ, Guderian JA, Brandt L, Dillon DC, *et al.* Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a

tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombination protein. J Immunol 2004; 172: 7618-28.

41. Langermans JA, Doherty TM, Vervenne RA, van der Laan T, Lyashchenko K, Greenwald R, *et al.* Protection of macaques against Mycobacterium tuberculosis infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT6. Vaccine 2005; 23: 2740-50.

42. Girard MP, Fruth U, Kieny MP. A review of vaccine research and development: Tuberculosis. Vaccine 2005; 23:5725-31.

43. Spier RE. International meeting on the nucleic acid vaccines for the prevention of infectious disease and regulating nucleic acid (DNA) vaccines. Vaccine 1996; 14: 1285-88.

44. Han SH, Moraes JZ, Silva CL, Chammas R, Rodrigues MM. DNA vaccines. In: Artificial DNA: Methods and Applications. Editado por Yury e. Khudyakov & Howard A. Fields. CRC Press, 2002. Cap.9: p.329-61.

45. Gurnathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application and optimization. Ann Rev Immunol 2000; 18: 927-74.

46. Srivastava IK & Liu MA. Gene vaccines. Ann Intern Med 2003; 138: 550-59.

47. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science 1990; 247:1465-68.

48. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, *et al.* Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding viral protein. Science 1993; 269: 1745-49.

49. Donnelly JJ, Wahren B, Liu MA. Vaccines progress and challenges. J Immunol 2005; 175: 633-39.

50. Tonkinson JL, Stein CA. Patterns of intracellular compartmentalization, trafficking and acidification of 5'-fluorescein labeled phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxynucleotides in HL60 cells. Nucleic Acids Res 1994; 22: 4268-75, 1994.

51. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature 2000; 408: 740-45.

52. Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 2879-83.

53. Huygen K. Plasmid DNA vaccination. Microb Infect 2005; 7: 932-38.

54. Silva CL, Palacios A, Colston MJ, Lowrie DB. *Mycobacterium leprae* 65 hsp antigen expressed from a retroviral vector in a macrophage cell line is presented to T cells in association with MHC class II in addition to MHC class I. *Microb Pathog* 1992; 12: 27-38.
55. Lowrie DB, Tascon RE, Colston MJ, Silva CL. Towards DNA vaccine against tuberculosis. *Vaccine* 1994; 12: 1537-40.
56. Tascon RE, Colston MJ, Ragno S, Stavropoulos E, Gregory D, Lowrie DB. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. *Nat Med* 1996; 2: 888-92.
57. Lowrie DB, Silva CL, Colston MJ, Ragno S, Tascon RE. Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. *Vaccine* 1997; 15: 834-38.
58. Bonato VL, Lima VM, Tascon RE, Lowrie DB, Silva CL. Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect Immun* 1998; 66: 169-75.
59. Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL, Lima VM, Faccioli LH, Stavropoulos E, *et al*. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* 1999; 400: 269-271.
60. Coelho-Castelo AA, Santos Junior RR, Bonato VL, Jamur MC, Oliver C, Silva CL. B- lymphocytes in bone marrow or lymph nodes can take up plasmid DNA after intramuscular delivery. *Hum Gene Ther* 2003; 14:1279-85.
61. Lima KM, Bonato VL, Faccioli LH, Brandao IT, dos Santos SA, Coelho-Castelo AA, *et al*. Comparison of different delivery systems of vaccination for the induction of protection against tuberculosis in mice. *Vaccine* 2001; 14: 3518-25.
62. Bonato VL, Goncalves ED, Soares EG, Santos Junior RR, Sartori A, Coelho-Castelo AA, Silva CL. Immune regulatory effect of pHSP65 DNA therapy in pulmonary tuberculosis: activation of CD8+ cells, interferon-gamma recovery and reduction lung injury. *Immunology* 2004; 113: 130-38.
63. Silva CL, Bonato VL, Coelho-Castelo AA, De Souza AO, Santos SA, Lima KM *et al*. Immunotherapy with plasmid DNA encoding mycobacterial hsp65 in association with chemotherapy is a more rapid and efficient form of treatment for tuberculosis in mice. *Gene Ther* 2005; 12: 281-87.
64. Coelho-Castelo AA, Trombone AP, Rosada RS, Santos RR Jr, Bonato VL, Sartori A, *et al*. Tissue distribution of a plasmid DNA encoding Hsp65 gene is dependent on the dose administered through intramuscular delivery. *Genetic Vaccines Therapy*, published online, <http://www.gvt-journal.com/content/4/1/1>, DOI: [10.1186/1479-0556-4-1](http://dx.doi.org/10.1186/1479-0556-4-1), 2006.

65. McDonough KA & Kress Y. Cytotoxicity for lung epithelial cells is a virulence-associated phenotype of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995; 63: 4802-11.
66. Ministério da Saúde – website: www.saude.gov.br, 2005.
67. Haile M & Källenius G. Recent developments in tuberculosis vaccines. *Curr. Opin Infect Dis* 2005; 18: 211-15.
68. Swain SL. Regulation of the generation and maintenance of T-cell memory: a direct, default pathway from effectors to memory cells. *Microbes Infect* 2003; 5: 213-9.
69. Nagabhushanam V, Praszquier J, Cheers C. Molecular and immunological characterization of *Mycobacterium avium* 65KDa heat shock protein (Hsp65). *Immunol Cell Biol* 2001; 79: 454-61.
70. Abbas AK, Lichtman AH, Pober. *Imunologia celular e molecular*. In: *Imunidade aos micróbios*. Rio de Janeiro: Revinter; 2002. p.343-62.
71. Abbas AK, Lichtman AH, Pober. *Imunologia celular e molecular*. In: *Tolerância imunológica*. Rio de Janeiro: Revinter; 2002. p.212-25.
72. Skinner MA, Wedlock DN, de Lisle GW, Cooke MM, Tascon RE, Ferraz JC, *et al*. The order of prime-boost vaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG and a DNA vaccine encoding mycobacterial proteins Hsp65, Hsp70, and Apa is not critical for enhancing protection against bovine tuberculosis. *Infect Immun* 2005; 73: 4441-44.
73. Brown CA, Brown IN, Swinburne S. The effect of oral *Mycobacterium vaccae* on subsequent responses of mice to BCG sensitization. *Tubercle* 1985; 66: 251-60, 1985.
74. Buddle BM, Wards BJ, Aldwell FE, Collins DM, de Lisle GW. Influence of sensitization to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. *Vaccine* 2002; 20: 1126-33.
75. Olsen AW, Brandt L, Agger EM, van Pinxteren LA, Andersen P. The influence of remaining live BCG organisms in vaccinated mice on the maintenance of immunity to tuberculosis. *Scand J Immunol* 2004; 60: 273-77.
76. Ordway DJ, Martins MS, Costa LM, Freire MS, Arroz MJ, Dockrell HM, *et al*. Ventura FA. Increased IL-4 production in response to virulent *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculosis patients with advanced disease. *Acta Med Port* 2005; 18: 27-36.
77. Ordway DJ, Costa L, Martins M, Silveira H, Amaral L, Arroz MJ, *et al*. Increased Interleukin-4 production by CD8 and gammadelta T cells in health-care

workers is associated with the subsequent development of active tuberculosis. J Infect Dis 2004; 190: 756-66.

78. Manca C, Reed MB, Freeman S, Mathema B, Kreiswirth B, Barry CE 3rd, *et al.* Differential monocyte activated underlies strain-specific *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. Infect Immun 2004; 72: 5511-14.

79. Morein B, Villacres-Eriksson M, Ekstrom J, Hu K, Behboudi S, Lovgren-Bengtsson K. ISCOM: a delivery system for neonates and for mucosal administration. Auv Vet Med 1999; 41: 405-13.

80. Doherty TM & Andersen P. Vaccines for tuberculosis: Novel concepts and recent progress. Clin Microbiol 2005; 18: 687-702.

81. Power CA, Wei G, Bretscher PA. Mycobacterial dose defines the Th1/Th2 nature of the immune response independently of whether immunization is administered by the intravenous, subcutaneous, or intradermal route. Infect Immun 1998; 66: 5743-50.

82. Rogers PR & Croft M. Peptide dose, affinity, and time of differentiation can contribute to the Th1/Th2 cytokine balance. J Immunol 1999; 163: 1205-13.

83. Bretscher PA, Wei G, Menon JN, Bielefeldt-Ohmann H. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*. Science 1992; 257: 539-42.

84. Janeway CA & Bottomly K. Signals and signs for lymphocyte responses. Cell 1994; 76: 275-85.

85. Pelizon AC. Vacina gênica (DNAhsp65) para tuberculose em camundongos neonatos [Tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2006.

86. Basaraba RJ, Izzo AA, Brandt L, Orme IM. Decreased survival of guinea pigs infected with *Mycobacterium tuberculosis* after multiple BCG vaccinations. Vaccine 2006; 24: 280-86.

87. Zhang M, Hisaeda H, Sakai T, Li Y, Ishikawa H, Hao YP, *et al.* CD4⁺ T cells are required for HSP65 expression in host macrophages and for protection of mice infected with *Plasmodium yoelii*. Parasitol Inter 2001; 50: 201-09.

88. Polla BS & Katengwa S. Heat shock proteins and inflammation. Curr Top Microbiol Immunol 1991; 167: 93-105.

89. Skinner MA, Keen DL, Parlane NA, Yates GF, Buddle BM. Increased protection against bovine tuberculosis in the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) when BCG is administered with killed *Mycobacterium vaccae*. Tuberculosis 2002; 82: 15-22.

90. Brennan MJ. The tuberculosis vaccine challenge. *Tuberculosis* 2005; 85: 7-12.
91. Turner J, Rhoades ER, Keen M, Belisle JT, Frank AA, Orme IM. Effective preexposure tuberculosis vaccines fail to protect when they are given in an immunotherapeutic mode. *Infect Immun* 2000; 68: 1706-1709.
92. Zuany-Amorim C, Sawicka E, Manlius C, Le Moine A, Brunet LR, Kemeny DM, *et al.* Suppression of airway eosinophilia by killed *Mycobacterium vaccae*-induced allergen-specific regulatory T-cells. *Nat Med* 2002; 8: 625-29.
93. Floyd S, Ponnighaus JM, Bliss L, Nkhosa P, Sichali L, Msiska G, *et al.* Kinetics of delayed-type hypersensitivity to tuberculin induced by bacilli Calmette-Guerin vaccination in northern Malawi. *J Infect Dis* 2002; 186: 807-14.
94. Black GF, Weir RE, Floyd S, Bliss L, Warndorff DK, Crampin AC, *et al.* BCG-induced increased in interferon-gamma response to mycobacterial antigens and efficacy of BCG vaccination in Malawi and the UK: two randomized controlled studies. *Lancet* 2002; 259:1393-401.
95. Rook GA, Dheda K, Zumla A. Do successful tuberculosis vaccines need to be immunoregulatory rather than merely Th1-boosting? *Vaccine* 2005; 23: 2115-20.
96. Anderson MC. On koch's treatment. *Lancet* 1891; 651-52.
97. Rook GA, Dheda K, Zumla A. Do successful tuberculosis vaccines need to be immunoregulatory rather than merely Th1-boosting? *Vaccine* 2005; 23: 2115-20.
98. Lowrie DB. DNA vaccines for therapy of tuberculosis: where are we now? *Vaccine* 2006; 24: 1983-9.
99. Harries AD, Hargreaves NJ, Gausi F, Kwanjana JH, Salaniponi FM, *et al.* High early death rate in tuberculosis patients in Malawi. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5: 1000-05.
100. Rook GA, Dheda K, Zumla A. Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 661-7.

8. Lista de Abreviaturas

µg: micrograma
µL: microlitro
µm: micrometro
7H9 e 7H11: meio Middlebrook para cultura de bactérias
AB: estreptoavidina-peroxidase
Ag: antígeno (85A, 85B)
AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANOVA: análise de variância
APC: célula apresentadora de antígeno
ATCC: coleção americana de tipos de culturas
BCG: Bacilo de Calmette Guérin
BSA: soro albumina bovina
CD: marcadores de superfície
CO₂: dióxido de carbono
ConA: concanavalina A
CpG: citosina – fosfato – guanina
CPT: Centro de Pesquisas em Tuberculose
DC-SIGN: receptor de célula dendrítica
DNA: ácido desoxirribunucleico
DO: densidade óptica
E. coli: *Escherichia coli*
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM: erro padrão médio
ESAT6/Ag85b: vacina anti-TB baseada em proteína de fusão
H₂SO₄: ácido sulfúrico
HE: hematoxilina eosina
HSP: proteína de choque térmico (KDa 60, 65...)
IFN γ : interferon gama
Ig: imunoglobulina
IL: interleucina-4, 5, 6, 10, 13...
IPTG: isopropil β -tiogalactosídeo
KDa: kilodalton

LB: meio Luria-Bertani
LT α : linfotóxina alfa
M. avium: *Mycobacterium avium*
M. bovis: *Mycobacterium bovis*
M. fortuitum: *Mycobacterium fortuitum*
M. kansasii: *Mycobacterium kansasii*
M. tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*
M. vaccae: *Mycobacterium vaccae*
M: molar
MHC: complexo principal de histocompatibilidade
mL: mililitro
Mtb32/Mtb39: vacina anti-TB baseada em proteína de fusão
NK: célula natural *killer*
nm: nonômetro
NOD: diabético não obeso - linhagem de camundongo
OPD: orto-fenilenodiamina
PBS: solução salina tamponada com fosfato
pcDNAhsp65: vacina gênica
pVAX: vetor plasmídico
pVAXhsp65: vacina gênica
rhsp65: proteína de choque térmico 65 KDa recombinante
RNA: ácido ribonucleico
RNI: reagente intermediário do nitrogênio
ROI: reagente intermediário do oxigênio
rpm: rotações por minuto
RPMI: meio líquido para cultura de células (Roswell Park Memorial Institute)
Sinam/MS: Sistema de Informação de Agravos de Notificação/Ministério da Saúde
T $\gamma\delta$: célula T gama delta
TB: tuberculose
TCR: receptor para antígeno em célula T
TE: tampão tris-EDTA
Th: linfócito T auxiliar de fenótipo 0, 1 ou 2

TLR: receptor do tipo *toll*

TNF α : fator de necrose tumoral alfa

Treg: Célula T regulatória

UFC: unidade formadora de colônia

USP: Universidade de São Paulo

WHO: Organização Mundial da Saúde



CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 389, sobre o projeto de pesquisa intitulado “Efeito de antígenos microbianos na imunidade induzida por vacina gênica” sob a responsabilidade da Profª. Drª. Alexandrina Sartori, com a participação Douglas Rodrigues Martins, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os Camundongos são provenientes de Biotério convencional sem condições de emitir atestado de sanidade.

Projeto de pesquisa aprovado em reunião da CEEA aos 05 de maio de 2.004



Profª Drª Norma Sueli P. Modolo
Presidente da CEEA



Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA