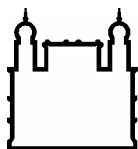


**INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE AVALIAÇÃO DE
PROTÓTIPOS VACINAIS EM LINHAGEM DE MONÓCITO HUMANA
(THP-1)**

DANILO PARMERA

RIO DE JANEIRO
2007



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

DANILO PARMERA

**Desenvolvimento de um modelo de avaliação de protótipos
vacinais em linhagem de monócito humana (THP-1)**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos

RIO DE JANEIRO
2007

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas / ICICT / FIOCRUZ - RJ

P253 Parmera, Danilo

Desenvolvimento de um modelo de avaliação de protótipos vacinais em
linhagem de monócito humana (THP-1) / Danilo Parmera. – Rio de Janeiro,
2007.

xiii, 64 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos,
Tecnologia em Imunobiológicos, 2007.

Bibliografia: f. 56-64.

1. THP-1. 2. Vacina BCG. 3. Sm-14. 4. Vacina – Protótipo. 5. Citocinas.
I. Título.

CDD: 615.372

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico, Laboratório de Tecnologia Recombinate e no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Departamento de Micro-Imuno e Parasitologia, Serviço de Imunologia, Laboratório de Imunologia Celular, sob a orientação do Prof. Dr. Geraldo Rodrigues Garcia Armoa e Prof Dra. Maria da Glória Bonecini de Almeida.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

DANILO PARMERA

**Desenvolvimento de um modelo de avaliação de protótipos
vacinais em linhagem de monócito humana (THP-1)**

ORIENTADORES: Prof. Dr. Geraldo Rodrigues Garcia Armôa
Profª. Drª. Maria da Glória Bonecini de Almeida

Examinadores:

Prof. Dr. Douglas McIntosh – Bio-Manguinhos – Presidente

Profª. Drª. Cynthia Silveira Horn – IPEC/FIOCRUZ

Prof. Dr. Walter Martin Roland Oelemann – IMPPG/UFRJ

Rio de Janeiro

Dedico esta Dissertação a Deus,

pelo dom da vida.

a minha família

pelo carinho e apoio na minha trajetória,

à minha noiva, Fernanda,

pelo amor.

AGRADECIMENTOS

À FIOCRUZ, em nome de seu presidente Dr. Paulo Marchiori Buss, por proporcionar a excelência na produção de fármacos e imunobiológicos e no desenvolvimento científico de nosso país.

À Bio-Manguinhos, em nome do seu diretor Dr. Akira Homma, pela oportunidade e condições propiciadas à realização de uma pós-graduação profissional.

Ao IPEC, em nome da sua diretora Dra. Valdiléa Gonçalves Veloso, pelas condições propiciadas à realização da minha dissertação.

Ao orientador e amigo Prof. Dr. Geraldo Rodrigues Garcia Armôa por acreditar no meu potencial, pelos valorosos ensinamentos, apoio incondicional e incentivo aos trabalhos realizados.

À orientadora e amiga Prof^a. Dr^a. Maria da Glória Bonecini de Almeida pelas portas abertas de seu laboratório, possibilitando a execução deste trabalho e pela sincera atenção com que sempre me recebeu e pelo exemplo de pesquisadora.

Aos Professores, Coordenadora e Secretária do MPTI, que muito contribuíram na minha valorização humana e aos meios acadêmicos para ingresso, manutenção e término do curso.

À Dr^a. Cynthia Silveira Horn, pelas importantes contribuições durante a realização deste trabalho, em especial o experimento de proliferação celular.

Ao Dr. Douglas MacIntosh, pelas importantes contribuições durante a realização deste trabalho, em especial no auxílio na realização dos ensaios de *western blotting*, no cultivo das amostras de BCG e na revisão deste manuscrito.

Aos amigos Ana Paula Argondizzo, João Pedro Souza Santos, Gabriela dos Santos Esteves, Dilzamar Velloso do Nascimento, Dr. José Procópio Senna, Dr. Marco Antônio Medeiros, Natália Plínio dos Santos, Dra. Elezer Monte Blanco Lemes, Camilla Bayma, Dra. Ana Carolina Góes pelo companheirismo, amizade, solidariedade e apoio pessoal e profissional.

À amiga Maria Luiza Azevedo pela amizade, eficiência, disponibilidade de auxílio em todos os momentos e palavras reconfortantes nos momentos de desespero.

À doutoranda e amiga Ana Teresa Fernandes pela alegria e disposição no auxílio dos experimentos de imunocitoquímica

Aos tecnologistas e amigos Andréia Lamoglia e Márcio Mantuano pelo auxílio na realização dos experimentos realizados no citômetro de fluxo.

À amiga Larissa Catharina Costa pela colaboração e dedicação nos experimentos infinitos e pelos momentos divertidos no laboratório.

Ao amigo Dyego Carletti pelo auxílio no experimento de proliferação celular.

Aos colaboradores e amigos do Serviço de Imunologia, Dra. Liane Castro, Carla Bial, Márcia Andrade, Millena Rosalba, Ana Cristina Santiago Leandro, Marcelo Leandro, Leonardo Gatto, Silvia Silva, Regina Pimenta, Maristela Lima, Monique Lima e a equipe do laboratório de Imunodiagnóstico pelo companheirismo e apoio.

Aos companheiros do Mestrado Profissional, no qual dividimos boa parte de nossas manhãs, pela cooperação e companheirismo.

Aos parentes e amigos pelos momentos de descontração, conversas, apoio, amizade, alegrias e tristezas compartilhadas. (por serem muitos não serão citados, mas estarão sempre em minha memória)

A todas as pessoas que não foram nominalmente mencionadas, mas que contribuíram para viabilizar este trabalho.

E, finalmente, a Deus, que proporcionou a mim e a minha família os meios possíveis para alcançar a felicidade.

"ESPERE O MELHOR, PREPARE-SE PARA O PIOR E ACEITE O QUE VIER."

Provérbio Chinês

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	lx
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3. METODOLOGIA.....	15
3.1 Cultivo da célula THP-1.....	15
3.2. Cultivo das cepas de BCG.....	16
3.3 Avaliação da expressão da proteína recombinante Sm14 em BCG/ <i>sm14</i>	17
3.4 Padronização da multiplicidade de infecção (MOI) do BCG-P.....	18
3.5 Infecção com BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles em células THP-1.....	19
3.6 Avaliação da capacidade de proliferação celular da célula THP-1.....	19
3.7 Avaliação da estabilidade funcional (expressão do gene <i>kanR</i>) do vetor de expressão pAU5 dos BCGr.....	20
3.8 Protocolo de imunocitoquímica para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1.....	20
3.9 Protocolo de citometria de fluxo para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1.....	22
4. RESULTADOS.....	24
4.1 Cultivo da célula THP-1.....	24
4.1.1 Meios de cultivo.....	24
4.1.2 Manutenção.....	24
4.2. Cultivo das cepas de BCG.....	25
4.3 Expressão da proteína Sm14 pelo BCG/ <i>sm14</i>	26
4.4 Multiplicidade de infecção (MOI) BCG:THP-1	26

4.5 Capacidade de proliferação da célula THP-1 infectada pelo BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles.....	29
4.6 Avaliação da viabilidade e estabilidade funcional (expressão do gene <i>kanR</i>) do BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles recuperados de células THP-1	30
4.7. Avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles em células THP-1 por imunocitoquímica	31
4.8 Avaliação das citocinas a partir da infecção com BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles em células THP-1 por Citometria de Fluxo	34
4.9 Comparação entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo.....	39
4.9.1 Detecção de IL-10.....	39
4.9.2 Detecção de IL-12.....	41
4.9.3 Detecção de TNF- α	43
5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÕES	54
7. PERSPECTIVAS	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	grau Celsius
μCi	micro Curie
μL	Microlitro
μg	Micrograma
ADC	Albumina – Dextrose – Catalase
APC	<i>Antigen presenting cells</i> – célula apresentadora de antígenos
API	Associação Panamericana de Infectologia
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATLA	<i>Alternatives to Laboratory Animals</i>
BCG	<i>Mycobacterium bovis</i> Bacilo Calmette-Guérin
BCG-P	<i>M. bovis</i> Bacilo Calmette-Guérin sub-cepa Pasteur 1173P2
BCGr	<i>M. bovis</i> Bacilo Calmette-Guérin recombinante
BCG/pAU5	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepa Pasteur transformado o vetor de expressão pAU5
BCGr/pPL73- <i>sm14</i>	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepa Pasteur 1173P2 transformado com vetor de expressão pPL73 contendo o gene <i>sm14</i> de <i>S. mansoni</i>
BCG/ <i>sm14</i>	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepa Pasteur 1173P2 transformado com o vetor de expressão pAU5 contendo o gene <i>sm14</i> de <i>S. mansoni</i>
Bio-Manguinhos	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
BP	<i>Band pass</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i> – grupo de diferenciação 4
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i> – grupo de diferenciação 8
cm ²	Centímetro quadrado
CMI	<i>Cell-mediated immunity</i> – Imunidade mediada por células
Com	Contagem por minuto
CO ₂	Gás carbônico
CpG	Dinucleotídeo formado pela ligação fosfodiéster de citosina com guanina na mesma fita de DNA
CTFA	<i>Cosmetic, Toiletries and Frangrance Association</i>

DAB	3-3' diaminobenzidina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> – Meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> – Ácido desoxirribonucleico
Dr(a).	Doutor(a)
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECVAM	<i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i>
EUA	Estados Unidos da América
FABP	<i>Fatty acid binding protein</i> - Proteína ligante a ácidos graxos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> – Isotiocianato de fluoresceína
FL	Análise de fluorescência (citometria de fluxo)
FRAME	<i>Fund for Replacement of Animal Medical Experiments</i>
FSC	<i>Foward angle light scatter</i>
g	Gramma
<i>g</i>	Aceleração gravitacional
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i> – Solução salina de Hank
HEPES	Acido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IFN	Interferon
IMPPG	Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
IRAG	<i>Interagency Regulatory Alternatives Group</i>
Kan	Canamicina
<i>KanR</i>	Gene de resistência à canamicina derivado do Tn903
kDa	Kilodaltons
LATER	Laboratório de Tecnologia Recombinante
log	Logaritmo
log ₁₀	Logaritmo na base 10
LPS	Lipopolissacarídeo

LSAB	<i>Labeled StreptAvidin Biotin</i>
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
M1	Macrófago tipo 1
M2	Macrófago tipo 2
MDM	<i>Monocyte-derived macrophage</i> – Macrófago derivado de monócito
MEM	<i>Minimum essential medium of Eagle</i> – Meio mínimo essencial de Eagle
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> - Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitro
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> – Multiplicidade de infecção
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Msc	Mestre
nº	Número
ng	Nanograma
NIAID	<i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i> - EUA
NK	<i>Natural killer cells</i> – Células matadoras naturais
nm	Nanômetro
O ₂	Gás oxigênio
OADC	Ácido oléico – Albumina – Dextrose – Catalase
<i>oriE</i>	Origem de replicação do bacteriófago T4 de <i>Escherichia coli</i>
<i>oriM</i>	Origem de replicação do plasmídeo pAL5000 de <i>Mycobacterium fortuitum</i>
PA	<i>pro analisis</i> - para análise
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> – Padrões moleculares associados ao patógeno
PAPES	Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde
pAU5	Vetor de expressão citoplasmático
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> - Células mononucleares do sangue periférico
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> - Salina tamponada de fosfato

PBS-T	<i>Phosphate-buffered saline Tween20</i> - Salina tamponada de fosfato com Tween20
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
PE	<i>Phycoerythrin</i> - Ficoeritrina
pH	Potencial hidrogenionico
<i>Phsp60*</i>	Promotor <i>hsp60</i> de <i>Mycobacterium bovis</i> BCG modificado
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
POPOP	p-bis[2(5-. feniloxazoil)]-benzeno
PPO	2,5-difeniloxazol
Prof(a)	Professor (a)
PRR	<i>Pattern-recognition receptors</i> – Receptores de reconhecimento padrão
R1	Região de análise (citometria de fluxo)
Reg	Registro
rpm	Rotação por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> – Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SFB	Soro fetal bovino
SLIPE	Sociedade Latinoamericana de Infectologia Pediátrica
Sm14	Proteína de <i>Schistosoma mansoni</i>
Sm14r	Proteína recombinante de <i>S. mansoni</i> expressa em <i>E. coli</i>
<i>sm14</i>	Gene de <i>S. mansoni</i>
SSC	<i>Side angle light scatter</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> – Salina tamponada de Tris
TBS-T	<i>Tris-buffered saline Tween 20</i> – Salina tamponada de Tris com Tween 20
Tc	<i>T cytotoxic cell</i> – Célula T citotóxica
TCR	<i>T cell receptor</i> – receptor de célula T
TDR	<i>Special programme for research and training in tropical disease</i>

TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i> - Fator transformador de crescimento beta
Th	<i>T helper cell</i>
Th1	<i>T helper cell type 1</i> – Célula T auxiliar tipo 1
Th2	<i>T helper cell type 2</i> – Célula T auxiliar tipo 2
Timidina-H ³	Timidina tritiada
TLR	<i>Toll like receptor</i> – Receptor do tipo Toll
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alfa</i> - Fator de necrose tumoral alfa
TPA	12-O-tetradecanolforbol-13-acetato
Treg	<i>T regulatory cell</i> – Célula T regulatória
UFC	Unidades formadoras de colônias por mililitro
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
v	Volume
WHO	<i>World Health Organization</i> – Organização Mundial da Saúde
x	Vezes

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Características das cepas de BCGs	16
Tabela 3.2: Anticorpos utilizados no protocolo de imunocitoquímica.....	21
Tabela 3.3: Anticorpos utilizados no protocolo de citometria de fluxo.....	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Visão esquemática da indução do sistema imune gerada por um patógeno ou uma vacina.....	08
Figura 1.2: Diagrama do modelo molecular da proteína Sm14.....	11
Figura 4.1: Microscopia óptica (200 x) de células THP-1, após três passagens, mantidas em meio RPMI 1640 preparado com 0,2% de NaHCO ₃ e suplementado com 10% de SFB.....	24
Figura 4.2: Cultura de <i>M. bovis</i> BCG Pasteur cultivado em meio 7H11 suplementado com 10% de OADC.....	25
Figura 4.3: Expressão da proteína Sm14 produzida pelos quatro clones de BCG/ <i>sm14</i> utilizados nos experimentos de infecção.....	26
Figura 4.4: Expressão de IL-10, IL-12 e TNF- α em células THP-1 infectadas com BCG-P.....	28
Figura 4.5: Atividade proliferativa das células THP-1 infectadas pelo BCG/ <i>sm14</i> e pelos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5)	29
Figura 4.6: Cinética da viabilidade do protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e dos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5) recuperados de células THP-1 e cultivados nos meios Middlebrook 7H11 7H11/Kan.....	31
Figura 4.7: Microscopia óptica (1000 x) de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após 24 horas de infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), detectadas por imunocitoquímica.....	32
Figura 4.8: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica.....	33
Figura 4.9: Determinação da região de análise das células THP-1 mantidas em cultivo celular.....	34

Figura 4.10: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 TNF- α e após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	35
Figura 4.11: Gráfico tamanho (FSC) <i>versus</i> fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	36
Figura 4.12: Gráfico tamanho (FSC) <i>versus</i> fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	37
Figura 4.13: Gráfico tamanho (FSC) <i>versus</i> fluorescência (FL1 ou FL2) da avaliação de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	38
Figura 4.14: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria de fluxo.....	40
Figura 4.15: Percentagem de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria.....	42
Figura 4.16: Percentagem de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria.....	44
Figura 5.1: Modelo esquemático das etapas necessárias para implantação de novos fármacos e imunobiológicos.....	47

RESUMO

As culturas de células vêm sendo utilizadas extensivamente no desenvolvimento e na produção de uma variedade de produtos terapêuticos e profiláticos, tornando-se uma ferramenta indispensável para geneticistas, imunologistas, vacinologistas e a indústria farmacêutica. A adoção de sistemas de ensaios celulares *in vitro* tem sido aplicada como um método alternativo para a substituição ou diminuição do uso de animais nas fases de desenvolvimento, produção e testes de vacinas, demonstrando resultados promissores. Da mesma forma, sistemas computacionais podem ampliar a utilização desta ferramenta para etapas do desenvolvimento de vacinas candidatas na fase pré-clínica. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um protocolo *in vitro* utilizando culturas de células humanas - a linhagem de monócitos THP-1, para a seleção de um protótipo vacinal - a cepa Pasteur de *Mycobacterium bovis* BCG expressando o antígeno Sm14 de *Schistosoma mansoni* (BCG/sm14). Para isso foram empregadas duas metodologias – citometria de fluxo e imunocitoquímica, para a identificação do perfil da expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α . Foram utilizados como controles a cepa Pasteur do *M. bovis* BCG e a construção da cepa Pasteur do *M. bovis* BCG contendo o vetor de expressão pAU5 (BCG/pAU5). Após padronização, a multiplicidade de infecção utilizada para os experimentos foi de 10 bacilos para 1 célula THP-1 (10MOI). A expressão da proteína Sm14 foi detectada em todos os protótipos vacinais. Para assegurar que o protótipo BCG/sm14 era capaz de diferenciar a linhagem de monócitos THP-1 em macrófagos, avaliamos a taxa de crescimento celular e foi possível observar que após a infecção estas células apresentavam o índice de proliferação diminuído em 2 logs em relação à célula não infectada. O protótipo vacinal BCG/sm14 não mostrou diferenças quanto a capacidade de infecção, a taxa de persistência intracelular e a estabilidade da construção plasmidial. As duas metodologias empregadas mostraram resultados discrepantes em relação ao percentual de citocinas expressas após a infecção com o protótipo vacinal ou os BCG controles, mostrando um maior percentual de células positivas quando avaliados por citometria de fluxo. Contudo, mesmo com esta diferença observamos que o protótipo vacinal BCG/sm14 não alterou o perfil de expressão de IL-10, IL-12 e TNF- α . O fato do plasmídeo pAU5 ser um vetor de expressão citoplasmática, sugere que a proteína Sm14 não foi capaz de estimular a mudança de citocinas em monócitos humanos. Experimentos futuros devem investigar o papel do BCG/sm14 em macrófagos maduros, quanto a indução de citocinas pró e anti-inflamatórias, TLR, bem como na indução da resposta imune adaptativa, como a apresentação antigênica, na tentativa de melhor entender a resposta imune a esta vacina candidata.

ABSTRACT

Cell cultures has been used extensively in the development of a broad range of therapeutic and prophylactic products, and are an important tool for geneticists, immunologists, vaccinologists and the pharmaceuticals industry. *In vitro* cell assay has been applied as an alternative method to replace or diminish the use of animal model in the developmental, production in vaccine test phases, with promising results. Otherwise, computational methods should amplify the use of cell cultures tools to test candidate vaccines. The main goal of this work was to develop an *in vitro* protocol using human cell line – monocytic cell THP-1, to select a vaccine prototype – strain Pasteur *Mycobacterium bovis* BCG expressing *Schistosoma mansoni* Sm14-antigen (BCG/sm14). Two methodologies were employed – a flow cytometry and immunocytochemistry, to quantify the expression of IL-10, IL-12 e TNF- α . Pasteur *M. bovis* BCG and the strain Pasteur do *M. bovis* BCG containing the expression vector pAU5 (BCG/pAU5) were used as controls. Multiplicity of infection (MOI) was determined and showed a better 10 bacilli to 1 cells ratios, regarding the expression of intracellular cytokines. Sm14 protein expression was detected in all vaccine prototype before use. To assure that BCG/sm14 was able to differentiate monocytic THP1 cell line in mature macrophage, we evaluated the proliferative ration after BCGs infection and all strain showed the ability to induce monocytic THP1 cells maturation, diminishing in 2.0 logs the cell proliferation. No differences were seen in the uptake, intracellular persistence and plasmidial stability. Interestingly, we observe discrepant results regarding the amount of positive cells expressing cytokines detected by the two methods used, independent of which BCG was tested. The overall results obtained by the cytometric method was high than immunocytochemistry. However, beside these ambiguous results, no alteration in the IL-10, IL-12 and TNF-alfa profile was observed when BCG/sm14 was compared with BCG. These results point to the plamidial BCG construction pAU5 and its intracellular expression, suggesting no modification in the cytokine profile in human monocytic cell lines. Further experiments should be addressed to identify the role of BCG/sm14 in modulate mature macrophage and, the induction of adaptive immune response, as antigen presentation, pro- and anti-inflammatory cytokines, TLR expression and activation, to better understating the vaccine prototype immune response .

1. INTRODUÇÃO

A vacinologia é uma ciência combinatória que estuda a diversidade de agentes patogênicos, o sistema imune humano e preparações vacinais que possam modular a resposta imune para prevenir ou curar as doenças causadas por esses patógenos (Brusic, August & Petrovsky 2005). Sendo a vacina um imunógeno não-patogênico que ao ser inoculado em um indivíduo é capaz de induzir imunidade protetora contra um patógeno específico (Parslow 2004), a vacinação, bem como a limitação à exposição de pessoas saudáveis às infectadas e eliminação da fonte ou meios de disseminação do agente infeccioso, contribui para a prevenção de doenças. As propriedades necessárias para uma vacina ideal são: promover imunidade ao longo da vida, ser largamente protetora contra todas as variantes do patógeno, prevenir a transmissão de doença, induzir a imunidade rapidamente, ser eficaz em todas as pessoas vacinadas, transmitir a proteção materna ao feto, possuir baixo custo, ser estável, ser segura e necessitar de poucas ou, de maneira ideal, uma só administração que induza proteção. (Ada 2001, Beverley 2002, NIAID 2003).

O desenvolvimento das vacinas ao longo da história pode ser destacado de acordo com as revoluções tecnológicas aplicadas na vacinologia (Plotkin 2005a). No final do século XVIII o médico inglês Edward Jenner realizou a experiência que foi considerada o marco da imunologia como ciência. Jenner inoculou, a partir de arranhões feitos no braço de um menino de oito anos (James Phipps), o líquido extraído da vesícula causada pela varíola bovina da mão da ordenhadeira Sarah Nelmer (André 2003, Plotkin & Plotkin 2004). Contudo, somente quase um século após a descoberta de Jenner, Louis Pasteur desenvolveu o conceito que levaria à primeira revolução da vacinologia: a atenuação da virulência de patógenos, criando a primeira vacina em laboratório e instituindo o conceito de vacinação. Pasteur estabeleceu as bases do que ficou conhecida como abordagem clássica para o desenvolvimento de vacinas, que incluem o isolamento do patógeno, a perda da virulência (atenuação) e a imunização com partes do microrganismo ou o microrganismo inteiro (Plotkin & Plotkin 2004, Plotkin 2005b, Serruto & Rappuoli 2006).

No final do século XVIII, Salmon e Smith descreveram o conceito que levaria a segunda revolução tecnológica da vacinologia, a inativação do patógeno para o desenvolvimento de preparações vacinais. A expansão deste conceito levou a

construção de vacinas feitas a partir de toxinas detoxificadas (toxóides) e frações subcelulares como polissacarídeos, proteínas e conjugados (Plotkin & Plotkin 2004, Plotkin 2005a, Plotkin 2005b). A adaptação de cultura de células para o cultivo de vírus visando a obtenção de preparações vacinais foi considerada a terceira grande revolução tecnológica utilizada pela vacinologia (Plotkin & Plotkin 2004, Plotkin 2005a, Plotkin 2005b). A introdução de novas estratégias para o desenvolvimento de vacinas a partir da utilização de técnicas de biologia molecular como: clonagem de genes e expressão de proteínas recombinantes, criação de partículas defectivas, desenvolvimento de vetores vivos atenuados, sequenciamento de genomas, genômica comparativa, proteômica e vacinologia reversa; abriram novas fronteiras na vacinologia para a busca de preparações imunogênicas que sejam efetivas no combate às doenças infecciosas. Essa nova onda de desenvolvimento está sendo considerada como a quarta revolução tecnológica da vacinologia (Ellis 2004, Plotkin 2005a, Plotkin 2005b, Serruto & Rappuoli 2006).

A compreensão e a importância da resposta imune após a vacinação sofreram um avanço notável nos últimos anos (Saalmüller 2006), marcando assim uma nova era para o desenvolvimento de vacinas. Para Plotkin (2005b), o novo foco dos vacinologistas está no desenvolvimento de meios, como vetores, replicons, lipopeptídeos e adjuvantes que dirijam a polarização do sistema imune para uma resposta do tipo 1, ou seja, a estimulação da imunidade celular. Plotkin destaca também o desenvolvimento de novas rotas de imunização tais como intranasal, aerossol, transcutânea, oral e retal (Plotkin 2005b). Já para Rappuoli (2004), a vacinologia atual está focada no processo de obtenção de imunógenos a partir da investigação pan-genômica, análise por microarranjos de DNA (DNA *microarray*) e proteômica, numa abordagem conhecida como vacinologia reversa. Serruto e Rappuoli (2006) enfatizam que o futuro do desenvolvimento de vacinas está na chamada vacinologia estrutural, na qual através da resolução atômica e da estrutura dos antígenos potenciais, será realizado o desenho racional dos epítomos alvos usados como candidatos vacinais. Observa-se então que a integração entre a tecnologia básica, os avanços tecnológicos na biologia molecular e o aumento do entendimento da resposta imune são a base para o desenvolvimento de novos candidatos a preparações vacinais (Rosenthal & Zimmerman 2006).

A imunidade, ou resposta imune, pode ser dividida em dois tipos: a imunidade inata e a imunidade adquirida ou adaptativa. A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa contra agentes patogênicos e consiste no desencadeamento de

mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que já existiam antes do estabelecimento de uma infecção e que atuam da mesma forma em infecções sucessivas. As barreiras anatômicas (pele e epitélio de mucosa), barreiras fisiológicas (temperatura, áreas com baixo pH, mediadores químicos), fagócitos mono e polimorfonucleares e barreiras inflamatórias são parte da imunidade inata (Parslow 2004, Abbas & Lichtman 2005b, McCullough & Summerfield 2005). As células da imunidade inata utilizam receptores de reconhecimento padrão (*pattern-recognition receptors* – PRR) do tipo Toll (*Toll like receptors* - TLRs) para o reconhecimento de estruturas microbianas altamente conservadas que não estão presentes em células de mamíferos, como padrões moleculares associados ao patógeno (*pathogen-associated molecular patterns* – PAMPs). Os TLRs possuem a capacidade de reconhecer diferentes PAMPs, como seqüências CpG de DNA não metiladas, lipídeos e carboidratos complexos como lipopolissacarídeos (LPS) e ácidos teicóicos (Reis e Sousa 2004b, Krutzik *et al.* 2005, Rosenthal & Zimmerman 2006).

A imunidade adaptativa caracteriza-se por sua alta especificidade e por ampliar a magnitude da resposta após sucessivas exposições a um determinante antigênico. Além dos muitos mecanismos da imunidade natural necessários à eliminação dos microorganismos invasores, a imunidade adaptativa utiliza a seleção e a mutação somática na geração de seu repertório imune desenvolvendo duas outras propriedades adicionais: a memória em relação aos contatos anteriores com um determinado antígeno, de modo que as exposições subseqüentes estimulem respostas de defesa gradativamente mais efetivas, e a capacidade de amplificar os mecanismos protetores da imunidade natural, direcionando-os para os locais de entrada do antígeno e melhorando o processo de eliminação dos elementos estranhos ao organismo hospedeiro (Costa-Carvalho & Solé 2000). A imunidade adaptativa é classificada como humoral ou celular em função do componente do sistema imunológico intermediador da resposta imune. A imunidade humoral é mediada por anticorpos, que são capazes de efetuar o reconhecimento específico agindo na neutralização de microorganismos e toxinas, na ativação do sistema do complemento e na opsonização de antígenos para aumento da fagocitose. A imunidade celular ou mediada por células (*cell-mediated immunity* – CMI) refere-se à resposta imune efetora das células T atuando na ativação de fagócitos, estimulação das atividades microbicidas dos macrófagos, células T e células *natural killer* (NK) na destruição de células infectadas. A CMI atua na defesa contra microorganismos

intracelulares, na imunidade antitumoral e na rejeição de aloenxertos (Parslow 2004, McCullough & Summerfield 2005).

As células T podem ser classificadas em dois grandes grupos de acordo com a expressão dos antígenos de superfície: T CD4 e T CD8. As células T CD8 efetoras são funcionalmente conhecidas como células T citotóxicas (T *cytotoxic* – Tc). As células Tc atuam principalmente na lise de células infectadas com patógenos presentes em seu citoplasma, desempenhando sua função através da liberação de dois tipos de citotoxinas: as granzimas, que são capazes de induzir apoptose na célula-alvo e as perforinas, que perfuram a membrana celular da célula-alvo facilitando a ação das granzimas (Esser *et al.* 2003, Kaufmann & Flynn 2005). Já as células T CD4 efetoras são funcionalmente conhecidas como células T auxiliares (T *helper* – Th). As células Th desempenham um papel central na função de vários processos como ativação, inibição, regulação, diferenciação e proliferação de diferentes tipos celulares como as células T CD8, células B, células NK, eosinófilos e macrófagos, tanto por contato célula-célula como pela produção de citocinas (Esser *et al.* 2003, Kidd 2003). As células Th são divididas principalmente em duas sub-populações fenotipicamente distintas, T *helper* tipo 1 (Th1) ou T *helper* tipo 2 (Th2), que proporcionam a estruturação de um modelo útil na compreensão da imunorregulação dependente de célula T (Mosmann & Coffman 1989, Mosmann 1991, McCullough & Summerfield 2005).

O conceito de células Th1/Th2 baseia-se na dicotomia do perfil de citocinas expressas, uma vez que cada sub-população de célula Th amplifica a si mesma e promove a regulação cruzada da sub-população recíproca. As citocinas produzidas por células Th1 são reconhecidamente capazes de suprimir a proliferação celular, a síntese de citocinas e/ou a atividade biológica induzidas por citocinas da resposta Th2, e vice-versa. Nas respostas imunes geradas pelas células Th1 as principais citocinas produzidas são as interleucinas (IL) 2 e o interferon gama (IFN- γ) direcionando o sistema imune para uma resposta mediada por células. A produção de anticorpos não é uma característica proeminente da resposta Th1, mas sua combinação com a resposta celular é necessária no combate de infecções intracelulares e fúngicas e de células cancerosas através de mecanismos diretos (destruição de células infectadas) e indiretos como a ação do interferon na proteção de células não infectadas (Esser *et al.* 2003, Kidd 2003, Rosenthal & Zimmerman 2006). Já as respostas imunes geradas pelas células Th2 são especialmente eficazes contra parasitas extracelulares e toxinas por mecanismos dependentes de

anticorpo e as citocinas dominantes produzidas são IL-4, IL-5, IL-10, e IL-13, direcionando para uma alta produção de anticorpos (Esser *et al.* 2003, Kidd 2003, Clingan *et al.* 2006, Rosenthal & Zimmerman 2006).

As células T não possuem receptores capazes de reconhecer diretamente antígenos. Os receptores de antígenos das células T (*T cell receptors* – TCRs) reconhecem somente fragmentos de antígenos expostos na superfície de outras células associados principalmente a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (*Major histocompatibility complex* - MHC). Há dois tipos principais de moléculas de MHC, denominadas de moléculas de MHC de classe I e moléculas de MHC de classe II e seu padrão de expressão está intimamente ligado às funções das células T. As moléculas MHC de classe I são expressas por todas as células do organismo exceto hemácias, sendo complexadas a antígenos encontrados no citoplasma celular e reconhecidas pelas células Tc. As moléculas MHC de classe II são expressas principalmente por células especializadas conhecidas como células apresentadoras de antígenos (*antigen presenting cells* – APC), que apresentam antígenos oriundos de vesículas endocíticas as células Th (Esser *et al.* 2003).

As APCs são células especializadas na captura de microorganismos e outros antígenos, na apresentação desses antígenos às células T e na expressão de sinais que estimulam a proliferação e diferenciação de linfócitos (Takahashi 2003, Abbas & Lichtman 2005b), possuindo um papel crucial na interação entre as imunidades inata e adaptativa. Seus principais representantes são as células dendríticas, os linfócitos B e os macrófagos (Guermonprez *et al.* 2002, Abbas & Lichtman 2005b). As células dendríticas são conhecidas como APCs profissionais por possuírem como função a captura e a apresentação de antígenos às células T virgens, promovendo juntamente com sinais co-estimulatórios, a expansão clonal e a diferenciação em células T efetoras (Guermonprez *et al.* 2002, Takahashi 2003, Reis e Sousa 2004a). As células B, dentre outras funções, são capazes de apresentar antígenos às células T efetoras sendo essenciais para a produção de anticorpos dependentes de células Th (Parlow 2004).

Os macrófagos são células fagocitárias mononucleadas, derivados dos monócitos sanguíneos e são encontrados nos tecidos desempenhando importantes papéis nas respostas imunes inata e adquirida. Possuem um papel central na resposta inicial à infecção antes da ação da imunidade mediada pelas células T e B, sendo importantes na fase de indução de inflamação, reorganização e reparo dos

tecidos, além de realizarem funções efetoras. São classificados como células apresentadoras de antígenos e têm diversas atividades, como atividade antimicrobiana e antitumoral, modulação de várias células, e promoção de quimiotaxia (Auwerx 1991, Mills *et al.* 2000, Berges *et al.* 2005).

Os macrófagos foram denominados M1 e M2 de acordo com o seu padrão de ativação (Mills *et al.* 2000). Assim, macrófagos M1 provenientes de células Th1 apresentam uma resposta efetora caracterizada pela produção dominante de óxido nítrico (NO) em resposta ao LPS ou IFN- γ exógeno. Macrófagos M2, de linhagens Th2, por sua vez, exibem um perfil tolerante caracterizado pela produção de altos níveis de fator transformador de crescimento beta (*transforming growth factor beta* - TGF- β) (Bastos *et al.* 2002, Mantovani, Sica & Locati 2005). O padrão de ativação assumido por esses macrófagos parece ser independente de linfócitos, uma vez que macrófagos de camundongos apresentam a mesma polarização. Esse fato sugere a importância das citocinas produzidas por essas células na regulação de suas funções. A influência da IL-10, IL-12, IL-18, IFN- α e IFN- γ na regulação autócrina de macrófagos tem sido descrita, demonstrando que os macrófagos não apenas obedecem às ordens dos linfócitos T, como podem até mesmo comandar o tipo de resposta dessas células. Adicionalmente, através das citocinas produzidas por eles, são aptos a se auto-regularem (Di Marzo *et al.* 1994, Fantuzzi *et al.* 2000, Mills *et al.* 2000, Xing, Zganiacz & Santosuosso 2000, Bastos *et al.* 2002, Mantovani, Sica & Locati 2005).

As citocinas constituem um grupo de proteínas de baixo peso molecular, geralmente glicosiladas, secretadas por diferentes células do sistema imune, como linfócitos, monócitos e macrófagos. Suas ações são geralmente pleiotrópicas, podendo atuar de forma autócrina, parácrina e endócrina, na mediação de diferentes efeitos biológicos (Abbas & Lichtman 2005a). Dentre as citocinas utilizadas para a avaliação de protótipos vacinais na ativação de APCs, podemos destacar TNF- α , IL-10 e IL-12 (Henriques & Sampaio 2002, Abbas & Lichtman 2005a). A IL-10 é uma citocina reguladora secretada por macrófagos ativados e por algumas células Th. Tem ação anti-inflamatória, agindo na inibição de macrófagos e células dendríticas ativados, inibindo a ação de IL-12, TNF- α e IFN- γ , com efeitos associados ao término das reações da CMI (Standiford 2000, Atkinson *et al.* 2000, Abbas & Lichtman 2005a). A IL-12 é a principal citocina mediadora da resposta imune inata a patógenos intracelulares, dentre os quais as micobactérias, sendo um importante indutor de CMI. Atua na ativação de células T citotóxicas e células NK induzindo a

produção de INF- γ , o qual ativa os macrófagos infectados e na diferenciação das células Th1, possuindo um importante papel na interação entre a imunidade inata e adaptativa (Atkinson *et al.* 2000, Abbas & Lichtman 2005a). O TNF- α é uma das principais citocinas mediadoras da resposta pró-inflamatória produzida principalmente por fagócitos mononucleares ativados além de células T, células NK e mastócitos. Atua principalmente no recrutamento de neutrófilos e monócitos para os sítios de infecção, na indução de macrófagos e células endoteliais para secreção de quimiocinas e na indução de apoptose em algumas células (Atkinson *et al.* 2000, Standiford 2000, Abbas & Lichtman 2005a).

Os monócitos e macrófagos possuem um papel crucial na apresentação de antígenos estranhos a outras células do sistema imune e na produção de sinais que direcionam o padrão da resposta imune necessária para cada tipo de patógeno. Dentre os sinais podemos destacar as citocinas, que são proteínas imunomoduladoras que ajudam a direcionar a resposta imune em diversos processos inflamatórios incluindo processos infecciosos (Xing, Zganiacz & Santosuosso 2000, Berges *et al.* 2005). Por essas características, os macrófagos vêm sendo utilizados para avaliar o perfil imunogênico de diferentes antígenos candidatos à vacina (Campbell, Mann & Chadee 2000, Misumi *et al.* 2003, Ciabattini *et al.* 2006). Adicionalmente, é importante considerar que entre os principais requerimentos para o sucesso da vacinação está a ativação das APCs, que envolve o processamento de antígenos, a expressão de fatores co-estimulatórios, e a secreção de citocinas, que é essencial para o início da resposta imune (Ada 2004).

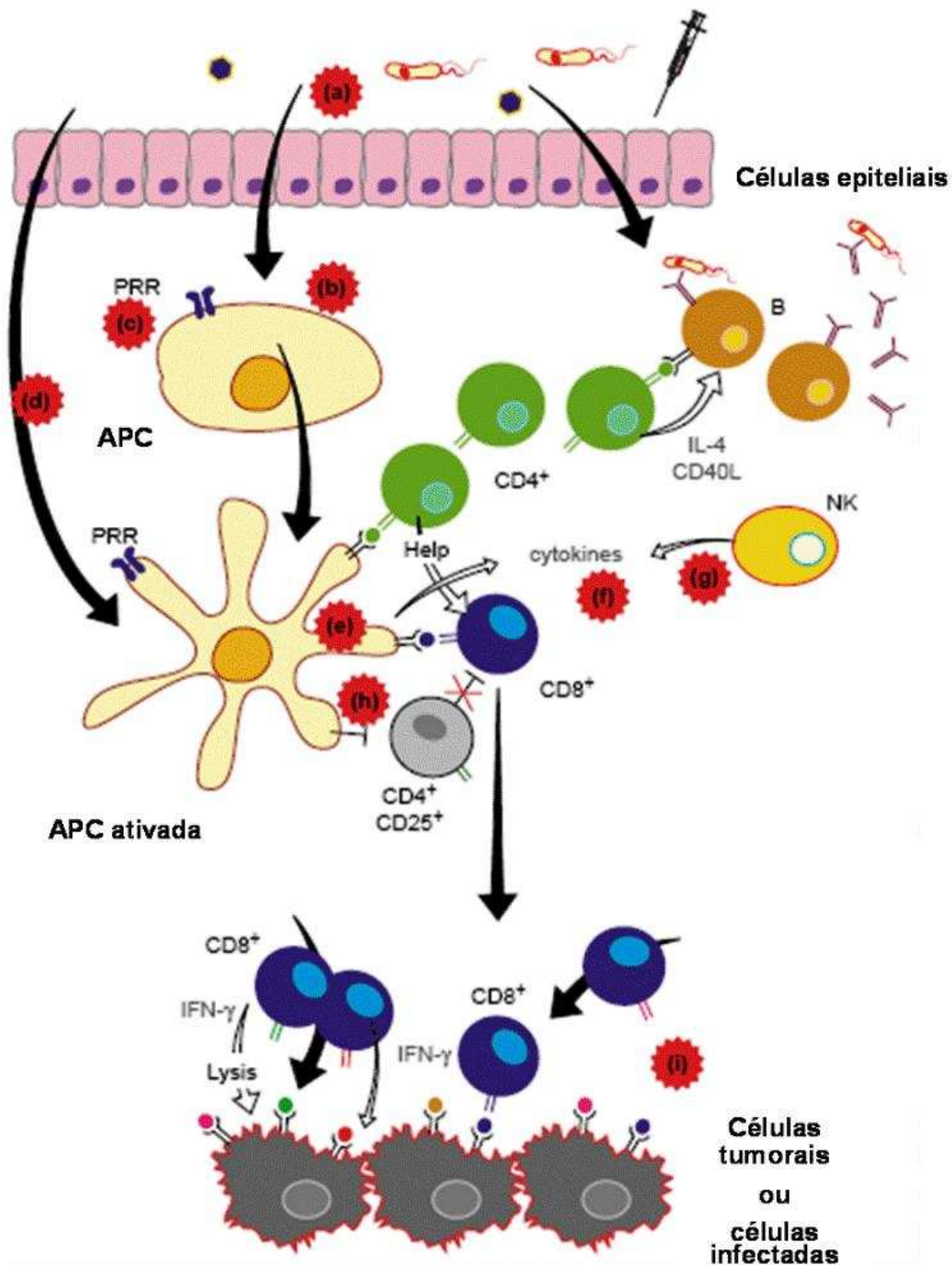


Figura 1.1: Visão esquemática da indução do sistema imune gerada por um patógeno ou uma vacina (Adaptado de Wack & Rappuoli 2005). As letras de (a) a (i) indicam situações onde o melhoramento de vacinas pode levar a respostas imunes mais eficientes. (a) A via de inoculação pode influir no tipo de resposta imune e reduzir o número de doses. (b) O antígeno particulado é reconhecido mais facilmente por APCs em relação ao antígeno solúvel. (c) Aumento da ativação de APCs através do reconhecimento de imunoestimulantes pelas PRRs. (d) A maturação e o carreamento de antígenos *in vitro* pelas APCs são candidatos vacinais promissores. (e) A vacinação de DNA leva a uma maior eficiência na apresentação de antígenos pelas moléculas de MHC de classe I. (f) O uso de citocinas como adjuvante natural de vacinas. (g) O recrutamento de células NK pode ser relacionado à produção inicial de citocinas do tipo Th1. (h) As vacinas podem atuar no efeito regulatório das células Treg CD4 CD25 visando a quebra da tolerância imunológica. (i) A pré-existência de células T específicas para antígenos expressos por células tumorais não contidos na vacina expande-se após a vacinação, predominando na resposta anti-tumor.

O advento da cultura celular no início do século passado surgiu como um método para estudar o comportamento de células dos animais sem as variações sistêmicas que poderiam surgir no animal tanto durante a homeostase, como durante um estado de estresse de um experimento (Harrison 1910, Carrel 1912 *apud* Freshney 2000b). As culturas de células vêm sendo utilizadas extensivamente para o desenvolvimento e a produção de uma variedade de produtos terapêuticos e profiláticos incluindo hormônios, citocinas, enzimas, antibióticos e vacinas tornando-se, por essa razão, uma ferramenta indispensável para geneticistas, imunologistas, vacinologistas e, especialmente, para a indústria farmacêutica (Freshney 2000a, FDA 2006).

Em 1991, Auwerx comparou diferentes linhagens de células mielóides de origem humana (HL-60, U-937, KG-1, HEL e THP-1) e concluiu que as células THP-1, após o tratamento com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), podem servir de modelo para o estudo *in vitro* dos mecanismos de regulação gênica, funções fisiológicas e diferenciação monócito/macrófago, assim como podem ser utilizadas no estudo dos vários aspectos biológicos do macrófago como o seu papel nos mecanismos de defesa e como célula secretora (Stokes & Doxsee 1999, Medeiros, 2001, Oliveira, Charlab & Pessolani, 2001, Ritelli *et al.* 2003, Theus, Cave & Einsenach, 2004, Berges *et al.* 2005, Zhao *et al.* 2005, Amadori *et al.* 2006).

A célula THP-1 é um monócito obtido a partir do sangue de uma criança com leucemia aguda (Tsuchiya *et al.* 1980, ATCC 2006). Na sua caracterização foi descrito que essas células apresentam capacidade fagocítica, expressão de lisozima e teste negativo para o vírus Epstein-Barr (Tsuchiya *et al.* 1980). Além disso, não possuem atividade citolítica dependente de anticorpo e sua diferenciação pode ser induzida por compostos do tipo ésteres de forbol como, por exemplo, 12-O-tetradecanolforbol-13-acetato (TPA) ou PMA (Tsuchiya *et al.* 1980, Stokes & Doxsee 1999, ATCC 2006).

Theus, Cave & Einsenach (2004) destacaram que as vantagens do uso da linhagem celular THP-1 como modelo de diferenciação monócito/macrófago *in vitro* são a invariabilidade da sua função de macrófago e a reprodutibilidade do crescimento celular o que permite seu estudo em diferentes estágios (normal *versus* ativado). Além disso, foi demonstrado que a diferenciação da THP-1 pode ser utilizada como modelo experimental para maturação de células dendríticas humanas

(Berges *et al* 2005) e como modelo para a avaliação da resposta inflamatória a diferentes ácidos graxos poliinsaturados (Zhao *et al.* 2005).

Stokes e Doxsee (1999) demonstraram que as células THP-1 podem ser utilizadas como modelo para investigar as interações micobacterianas em macrófagos e Medeiros (2001) utilizou-as como substrato para a avaliação da estabilidade estrutural e funcional de cepas de *Mycobacterium bovis* bacilo Calmette-Guérin (BCG) recombinante (BCGr) expressando antígeno de *Bordetella pertussis*. Oliveira, Charlab & Pessolani (2001) compararam o nível de expressão de TNF- α em células THP-1 infectadas com BCG e *Mycobacterium leprae* e, posteriormente, o uso das células THP-1 foi proposto para o desenvolvimento de uma alternativa rápida para a detecção de *M. bovis* no diagnóstico de tuberculose bovina (Ritelli *et al.* 2003, Amadori *et al.* 2006), e como modelo para avaliação da virulência e da persistência intracelular de micobactérias modificadas geneticamente (Lewis *et al.* 2003).

O Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) vem trabalhando desde 1995, com o apoio dos programas PAPES (Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde) e PDTIS (Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e de Bio-Manguinhos, na tecnologia para modificação genética da vacina BCG com o objetivo de desenvolvimento de vacinas vetorizadas contra agentes infecciosos e parasitários. Nesse processo vários cepas de BCG recombinante (BCGr) foram construídas visando a expressão de antígenos protetores de diversos patógenos como *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, o vírus da Hepatite B, entre outros (Medeiros 2001, Santos 2002, Rezende *et al.* 2005, Medeiros *et al.* 2005). Como parte desse mesmo projeto Argondizzo desenvolveu, em 2005, diferentes protótipos vacinais de BCGr expressando a proteína Sm14 de *Schistosoma mansoni* (Figura 1.2) como possíveis alternativas vacinais para a imunoprevenção da esquistossomose.

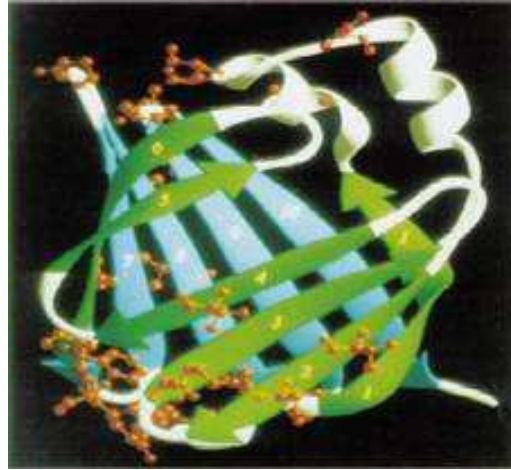


Figura 1.2: Diagrama do modelo molecular da proteína Sm14 (Adaptado de Tendler *et al* 1996)

A esquistossomose é um problema mundial. Estima-se atualmente que pelo menos 200 milhões de pessoas estejam infectados pelo *Schistosoma mansoni* e que mais de 600 milhões de indivíduos estejam em risco no Brasil e no mundo (Argondizzo 2005, Varaldo *et al.* 2006). Dentre as razões para a obtenção de uma vacina efetiva contra o *Schistosoma mansoni* está a elevada frequência da doença na população de muitas regiões, principalmente em países em desenvolvimento, podendo levar os pacientes com a forma hepatoesplênica a um padecimento crônico grave e mortal, sendo assim um grande desafio para a Saúde Pública (WHO 2000). No entanto, a Organização Mundial da Saúde (WHO) através de seu Programa Especial para Treinamento e Pesquisa (TDR), identificou seis antígenos como candidatos para o desenvolvimento de uma vacina. Dentre esses antígenos destaca-se a proteína Sm14, que é uma proteína ligante a ácidos graxos (FABP), de 14 kDa presente no esquistossômulo adulto (Chitsulo *et al.* 2000, WHO 2000, Al-Sherbiny *et al.* 2003).

Na busca de uma vacina candidata contra a esquistossomose, a estratégia de utilização da vacina BCG como vetor para a expressão de antígenos de *S. mansoni* *in vivo* é provavelmente uma das iniciativas mais importantes e de melhor relação custo - benefício no momento para o controle da esquistossomose em países sub-desenvolvidos ou em desenvolvimento (Kremer *et al.* 1998, Dai *et al.* 2003, Varaldo *et al.* 2004, Argondizzo 2005, Varaldo *et al.* 2006). Isso ocorre porque o BCG apresenta um elenco de vantagens de difícil superação entre os vetores vivos atenuados disponíveis no momento, tais como o fato de já ter sido administrado a

bilhões de pessoas no mundo inteiro com baixo índice de efeitos colaterais, poder ser administrado em qualquer época após o nascimento, não ser afetado pelos anticorpos maternos, apresentar baixo custo de produção e ser uma das vacinas mais termoestáveis que se conhece (Smith & Starke 2004, Bonah 2005, SLIPE & API 2005, WHO 2006). Além disso, possui baixo custo de produção, é estável do ponto de vista da atenuação, é controlável por antibióticos, apresenta tropismo por células responsáveis pela montagem da resposta imune (células dendríticas, macrófagos e células linfóides) e é capaz de induzir uma resposta imune celular e humoral contra bactérias, vírus, parasitas e toxinas (Ohara & Yamada 2001, Smith & Starke 2004, SLIPE & API 2005, WHO 2006). Essas características fazem do BCG um dos mais promissores vetores vivos atenuados para uma plataforma vacinal visando a liberação de antígenos heterólogos protetores *in vivo* (Medeiros 2001, Ohara & Yamada 2001, Santos 2002, Smith *et al.* 2001, Argondizzo 2005, Varaldo *et al.* 2004, Varaldo *et al.* 2006).

A capacidade do *M. bovis* BCG sub-cepa Pasteur transformado com plasmídeo pPL73 expressando a proteína Sm14 de *S. mansoni* (BCGr/pPL73-sm14) de induzir efeito protetor semelhante ou maior do que a proteção induzida por três doses da mesma proteína produzida e purificada a partir de *Escherichia coli*, foi avaliada na Fundação Oswaldo Cruz utilizando modelo murino para estudos de proteção, via intraperitoneal, com uma ou duas doses do BCGr/pPL73-sm14, em combinação ou não, com uma dose de reforço da proteína recombinante Sm14 purificada. Nessas condições demonstrou-se que o BCGr/pPL73-sm14 em dose única foi capaz de induzir aproximadamente 50% de proteção. No entanto, apesar dos camundongos vacinados com BCGr/pPL73-sm14 via intraperitoneal não apresentarem anticorpos anti-Sm14, esplenócitos desses animais liberaram IFN- γ quando estimulados com a proteína recombinante Sm14r, sendo assim capaz de induzir níveis de proteção similares àqueles induzidos pela proteína Sm14r, com a vantagem do BCGr/pPL73-sm14 ser administrado em dose única (Varaldo *et al.* 2004).

Apesar da existência na FIOCRUZ de modelo murino de proteção padronizado e aprovado internacionalmente para a avaliação de protótipos vacinais contra a esquistossomose, o grande desafio do projeto para uma nova vacina, com o protótipo BCG/sm14, é a demonstração de proteção em modelo humano. Por essa razão, objetivamos nesse trabalho o desenvolvimento de um protocolo visando o uso de células humanas na avaliação e seleção de vacinas candidatas contra a

esquistossomose. Com essa finalidade, utilizamos como substrato monócitos humanos derivados da linhagem THP-1 para avaliação e quantificação da expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α verificadas após a infecção das células THP-1 com o protótipo vacinal BCG/*sm14*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Demonstrar a viabilidade de um sistema de avaliação *in vitro* para protótipos vacinais baseado no perfil de citocinas expressas pela linhagem celular de monócitos humanos THP-1.

2.2 Objetivos Específicos

- Criar um protocolo de infecção com o *Mycobacterium bovis* BCG em células THP-1
- Avaliar a estabilidade funcional, o grau de infecciosidade e a persistência intracelular do protótipo vacinal BCG/*sm14* em células THP-1
- Avaliar a capacidade do protótipo vacina BCG/*sm14* de induzir a diferenciação e maturação de células THP-1
- Avaliar, quantificar e comparar a expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α após infecção com protótipo vacinal BCG/*sm14* e com os BCGs controles (BCG Pasteur e construção BCG/pAU5) em células THP-1

3. METODOLOGIA

3.1 Cultivo da célula THP-1

A linhagem celular THP-1 (ATCC nº. TIB 202) foi obtida do acervo do Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) de Bio-Manguinhos, Fiocruz mantidos em nitrogênio líquido (-196°C) por no máximo de 12 meses. As células foram descongeladas de criotubos Posteriormente, foram realizadas três lavagens com PBS [137mM de NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 2.7mM KCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 10mM Na₂HPO₄ (Merck) e 1.8mM KH₂PO₄ (Merck)] 1X pH 7.4. Para a manutenção celular foram testados, diversos meios de cultura (MEM, D-MEM e RPMI 1640) e suplementos [soro fetal bovino inativado – SFB (Gibco Life Technology / Invitrogen, Grand Island, EUA), HEPES (Gibco), L-glutamina Sigma-Aldrich), NaHCO₃ (Merck), 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), piruvato de sódio (Sigma-Aldrich), estreptomicina/penicilina (Gibco), gentamicina (Gibco)]. Após observação morfológica das células por microscopia óptica (400 x), definiu-se que para os experimentos propostos seria utilizado o meio de cultura foram cultivadas inicialmente em meio RPMI 1640 (Gibco) formulado com 0,2% (v/v) de NaHCO₃ (Sigma-Aldrich), suplementado com 20% (v/v) de SFB e mantidas em garrafas T de 25 cm² (Corning, Corning, EUA) a 37°C em atmosfera com 5% de gás carbônico (CO₂) por 3 dias.

Quando da necessidade de se ampliar o acervo desta linhagem, as células foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos, lavadas duas vezes em PBS e ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB. A concentração e viabilidade celular foram determinadas em hemocítmetro por microscopia óptica (100 x) utilizando-se a diluição de 1:50 em azul de tripan 0,4% (Gibco). Para a criação dos lotes de trabalho, após as etapas de centrifugação e lavagem, as células foram ressuspensas na concentração de 1 x 10⁷ células/mL em solução de criopreservação [90% SFB e 10% dimetil sulfoxido (DMSO - Sigma-Aldrich)] e mantidas em nitrogênio líquido a – 196°C.

No preparo das células para a realização dos experimentos, as células foram removidas do meio de cultura original, lavadas duas vezes em PBS, ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB. Após a quantificação as células foram ressuspensas na concentração de 1 x 10⁶ células/mL em RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB.

3.2. Cultivo das cepas de BCG

Para a presente proposta foi utilizado o protótipo vacinal *M. bovis* BCG sub-cepça Pasteur 1173P2 transformada com o vetor plasmidial pAU5 contendo o gene *sm14* de *S. mansoni* (BCG/*sm14*). Como controle dos experimentos, foram utilizados a amostra vacinal *M. bovis* BCG sub-cepça Pasteur 1173P2 (BCG-P), assim como o *M. bovis* BCG sub-cepça Pasteur transformado o plasmídeo pAU5 (BCG/pAU5). Os BCGs recombinantes foram desenvolvidos no LATER pelos pesquisadores Dr. Douglas MacIntosh e Msc. Ana Paula C. Argondizzo (Argondizzo 2005) (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Características das cepas de BCG

Cepas	Características
BCG-P	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepça Pasteur 1173P2
BCG/pAU5	<i>M. bovis</i> BCG sup-cepça Pasteur Vetor pAU5: <i>kanR</i> , <i>oriE</i> , <i>oriM</i> , <i>Phsp60</i> *
BCG/ <i>sm14</i>	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepça Pasteur Vetor pAU5/ <i>sm14</i> : <i>kanR</i> , <i>oriE</i> , <i>oriM</i> , <i>Phsp60</i> *, <i>sm14</i>

pAU5 - vetor de expressão citoplasmático

kanR - gene de resistência à canamicina derivado do Tn903

oriE - origem de replicação do bacteriófago T4 de *Escherichia coli*

oriM - origem de replicação do plasmídeo pAL5000 de *Mycobacterium fortuitum*

*Phsp60** - promotor *hsp60* de *Mycobacterium bovis* BCG modificado

sm14: gene de *Schistosoma mansoni*

Os BCGs foram estocados em alíquotas e armazenados a -70°C. No momento do uso as alíquotas foram descongeladas e cultivadas em 20 mL de caldo Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA) suplementado com 10% (v/v) da solução Albumina – Dextrose – Catalase (ADC - Difco), 0,05% (v/v) de Tween 80 (Merck) e 0,2% (v/v) de glicerol (Sigma-Aldrich) a 37⁰ C e 5% CO₂ por 10 dias, quando atingem a fase exponencial de crescimento.

Para o preparo dos inóculos, o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG e BCG-pAU5) foram obtidos a partir de culturas em fase exponencial. Os BCGs foram

centrifugados a 1950 x g e lavados duas vezes em PBS. Após a lavagem, a concentração de cada amostra de BCG foi ajustada com PBS para o padrão 1 da escala de MacFarland (MacFarland, 1907), ou seja, $3,0 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro. Uma alíquota de 10 μ L desta suspensão bacteriana foi quantificada em hemocitômetro por microscopia ótica (100x), para confirmação da leitura por turbidez.

Devido à dificuldade para a determinação da viabilidade dos BCGs em UFC utilizando o meio Middlebrook 7H10 (Difco) suplementado com 10% (v/v) de ADC preparado no laboratório, buscaram-se diferentes alternativas, como a substituição do lote do meio Middlebrook 7H10, utilização do meio Middlebrook 7H11 e suplementação dos meios com ADC e OADC comercial (Difco).

Em cada experimento, o número de bactérias viáveis foi determinado através de plaqueamento de diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) em triplicata, em meio ágar Middlebrook 7H11 (Difco) suplementado com 10% (v/v) da solução de Ácido oléico - Albumina - Dextrose - Catalase (OADC – Difco) e 0,2% (v/v) de glicerol. As placas foram incubadas por quatro semanas em estufa a 37°C em 5% CO₂.

3.3 Avaliação da expressão da proteína recombinante Sm14 em BCG/sm14

Para a confirmação da expressão da Sm14 pela cepa BCG/sm14 foi utilizado a técnica de *western blotting* com base no protocolo descrito por Argondizzo (2005). Amostras de 4 mL das culturas bacterianas foram centrifugadas por 5 minutos a 6500 x g a temperatura ambiente sendo o precipitado rompido por lise mecânica utilizando-se 0,5 g de pérolas de vidro de 0,5 mm de diâmetro (BioSpec Products – Bartlesville, EUA), 60 μ L de tampão Tris-HCl 1 mM 50 mM pH 6.8 e 20 μ L de tampão de amostra 4X (Tris-HCl 50mM pH 6,8, DTT 100mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%). As amostras foram agitadas inicialmente por 45 segundos sendo colocadas em gelo por um minuto e posteriormente agitadas por 30 segundos, utilizando-se o aparato “Mini Beadbeater” (Biospec Products, Bartlesville, Canada). Em seguida, as amostras foram fervidas por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida 13,5% [técnica de SDS-PAGE (Laemmli 1970)] com espaçador de 1 mm. A corrida foi realizada a 100 volts, no gelo. O material do gel foi transferido para membrana de duralose (Duralose – UVTM Membranes – Stratagene, La Jolla, CA, EUA), sendo a transferência realizada por 90 minutos a 90 volts, no gelo.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada em solução de 3% (p/v) de albumina bovina (BSA - Sigma-Aldrich) em PBS pH 7.4 com 0,02% (v/v) de Tween 20 (PBS-T) por um período de 2 horas a temperatura ambiente e sob leve agitação. A seguir a membrana foi incubada com o anticorpo primário policlonal anti-Sm14 (produzido em coelhos New Zealand no Laboratório de Esquistossomose Experimental, Departamento de Helminologia, IOC, FIOCRUZ), diluído 1:500 ou 1:1000. A membrana foi incubada com o anticorpo primário a temperatura ambiente por um período de 16 a 18 horas (*overnight*), a seguir a membrana foi lavada duas vezes com PBS-T por cerca de 40 minutos e duas vezes com PBS pelo mesmo tempo. O anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich), foi diluído na razão 1:30.000 em PBS-T e a membrana incubada por 2 horas sob agitação leve a temperatura ambiente. A seguir procederam-se novamente as lavagens como descrito anteriormente. Após as lavagens, a membrana foi revelada com 5 mL da solução “Western Blue^R Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase” (Promega, Madison, EUA).

3.4 Padronização da multiplicidade de infecção (MOI) do BCG-P

No intuito de verificar a produção de citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α por células THP-1 induzidas por diferentes inóculos de BCG-P, as células foram infectadas numa relação de 5, 10 ou 50 UFC de BCG para cada célula THP-1. Para este ensaio foram definidos apenas dois tempos de infecção: 4 e 24 horas. Foram incubadas 1×10^6 células THP-1 com 5×10^6 , 1×10^7 ou 5×10^7 de BCG-P, em triplicata, mantidos em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB em tubos cônicos de 1,5 mL e incubadas por 4 horas, sob agitação (120 rpm) a 37°C em ambiente com 5% CO₂.

Após este período, as amostras foram centrifugadas a 400 x g e lavadas três vezes com PBS. Após a lavagem, as amostras referentes a avaliação de 4 horas de infecção foram homogeneizadas com 1 mL de meio RPMI 1640, sendo retirados 100 μ L para a recuperação dos BCGs intracelulares, e 900 μ L para avaliação da expressão de citocinas secretadas por células THP-1 infectadas com BCG pela técnica de citometria de fluxo. Já as amostras de 24 horas de infecção, foram homogeneizadas com 1 mL de meio RPMI 1640 com 10% (v/v) de SFB e incubados, sob agitação (120 rpm) a 37°C em ambiente com 5% CO₂ até o término do tempo

proposto (24 horas) sendo posteriormente processadas da mesma forma que as amostras de 4 horas.

Para o acompanhamento da viabilidade dos BCGs intracelulares, nos 100 μ L retirados das amostras, foram adicionados 900 μ L de tampão PBS com 0,1% (v/v) de Tween 80 (Pro Analysis, Rio de Janeiro) e centrifugados por 10 minutos a 6500 x g, para lisar as células THP-1 e obter os BCGs antes internalizados. O precipitado então foi diluído em 100 μ L de meio Middlebrook 7H9 e plaqueado em meio Middlebrook 7H11 para determinação de UFC, como descrito no item 3.2.

3.5 Infecção do BCG/*sm14* e BCGs controles em células THP-1

Os experimentos envolvendo a produção de citocinas em células THP-1 infectadas com BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/ ρ AU5) foram realizados como descrito no item 3.4, utilizando MOI de 10 micobactérias para 1 célula THP-1 nos tempos de 4, 24 e 48 horas pós-infecção. Para a análise do perfil de citocinas expressas pela célula THP-1 infectada com as diferentes amostras de BCG utilizaram-se as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo.

3.6 Avaliação da capacidade de proliferação celular da célula THP-1

Para avaliar a capacidade de replicação e a viabilidade celular das células THP-1 infectadas com BCG/*sm14* e os BCGs controles, um cultivo celular foi estabelecido por um período de 24 e 48 horas após a infecção. As células THP-1 foram infectadas com MOI de 10 micobactérias para 1 célula THP-1 como descrito no item 3.3. As amostras contendo $2,5 \times 10^5$ células THP-1 infectadas ou não com os BCGs, foram suspensas em 100 μ L de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB por poço em placas de 96 poços. Dezesesseis horas antes do término do tempo de infecção, foi adicionado 1 μ Ci de timidina tritiada (Timidina-H³ - Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA) por poço e as placas foram mantidas em estufa a 37°C em ambiente com 5% CO₂. Ao término dos tempos de infecção (24h e 48h) as placas foram congeladas a -20°C até a realização da leitura.

No dia de leitura, as placas foram descongeladas a temperatura ambiente e as amostras foram transferidas através do coletor de células (Cell Harvester - Skation Instruments AS, Lier, Noruega) para o papel de filtro (FilterMAT - Skation Instruments AS). As amostras no papel de filtro foram colocadas em tubos de

cintilação sendo adicionado 1 mL por tubo de solução de cintilação [Difeniloxazol (PPO - Merck), Bis-feniloxazolilbenzeno (POPOP - Merck), Tolueno (Merck)]. As amostras foram contadas em espectrômetro de cintilação líquida (TRI-CARB® 1600 CA, Packard, Milano, Itália) e o resultado expresso em contagem por minuto (cpm).

3.7 Avaliação da estabilidade funcional (expressão do gene *kanR*) do vetor de expressão pAU5 dos BCGr

A confirmação das cepas recombinantes de BCG transformadas com os plasmídeos pAU5 e pAU5-*sm14* foi determinada através do plaqueamento de diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}), em triplicata, dos inóculos utilizados para infecção e dos BCGs recuperados das células THP-1 nos diferentes tempos de infecção (descrito no item 3.4), em meio ágar Middlebrook 7H11 suplementado com 10% (v/v) de OADC e 0,2% (v/v) de glicerol, adicionado ou não de 25 µg/mL de canamicina (Kan - Sigma-Aldrich), para a avaliação da expressão do gene *kanR* contido no vetor de expressão pAU5. As placas foram incubadas por quatro semanas para determinação de UFC em estufa a 37°C em ambiente com 5% CO₂.

3.8 Protocolo de imunocitoquímica para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1

As amostras das células THP-1 infectadas com o BCG/*sm14* e os BCGs controles foram removidas 4, 24 e 48 h após a infecção, centrifugadas a 400 x g, lavadas três vezes com PBS e mantidas em 1mL de PBS.

Utilizando uma centrífuga citológica (Citospin modelo 2400 – Fanem, São Paulo), as células foram transferidas para lâminas de microscopia (Solidor – Médico International Trading Co, Tianjin, China) previamente tratadas com 2 % (v/v) de silano (Sigma-Aldrich) em acetona PA (Merck). De cada amostra, foram adicionados 150 µL em cada orifício seguido de centrifugação a 1800 rpm por 3 minutos.

As células foram fixadas com 4% de paraformaldeído pH 7,4 (Sigma-Aldrich), por 15 minutos, e lavadas em tampão Tris base salina (TBS) com 0,2% (v/v) de Tween20 (Merck), pH 7,4 10 mM (TBS-T) por 10 minutos. A seguir, foram adicionados 50 µL de SFB diluído em TBS-T (1:100) por 30 minutos, com o objetivo de impedir ligações inespecíficas. Após a remoção do soro, foram adicionados 50 µL

dos anticorpos monoclonais primários (Tabela 3.2) diluídos em TBS-T. As lâminas foram incubadas em câmara úmida *overnight* a 4°C.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com TBS-T (3 banhos por 5 minutos cada) e incubadas com 50 µL de anticorpo secundário biotilado (Tabela 3.1). Após 30 minutos, as lâminas foram lavadas com TBS-T em três banhos por 5 minutos cada e foram adicionados 50 µL do complexo estreptoavidina-peroxidase (Dako, Glostrup, Dinamarca) por 30 minutos em câmara úmida, lavando-se em seguida três vezes por 5 minutos cada com TBS-T. Para a revelação, foram adicionados 50 µL em cada amostra da solução de 3-3' diaminobenzidina (DAB - Dako) sendo acompanhada a conversão da tonalidade em microscópio óptico (400 x). A reação foi finalizada mergulhando as lâminas em água destilada e, posteriormente, em água corrente. A seguir, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer (Dako) por 2 minutos, e posteriormente lavadas em água corrente. Logo após, as lâminas foram desidratadas em etanol (Merck) por 10 minutos, diafanizadas em xilol (Merck) por 10 minutos e montadas em “Faramount Mounting Medium, Aqueous” (Dako) entre lamínulas (Corning).

O percentual de células, expressando as citocinas IL-10, IL-12 e TNF-α após infecção com BCG/*sm14*, BCG-P ou BCG/pAU5 por 4, 24 e 48 horas foi determinado pela contagem de células positivas em um campo de duzentas células, utilizando microscopia óptica (1000x).

Tabela 3.2: Anticorpos utilizados no protocolo de imunocitoquímica

Anticorpo Primário	Origem	Diluição	Empresa	Anticorpo Secundário
anti-IL-10 humana	Rato	1:75	Mabtech AB Nacka Strand, Suécia	Coelho anti-rato (Dako)
anti-IL-12 (p70) humana	Camundongo	1:200	Mabtech AB Nacka Strand, Suécia	Kit LSAB – anti-camundongo, anti-coelho e anti-cabra (Dako)
anti-TNF-α humana	Cabra	1:25	R&D Systems Minneapolis, USA.	Kit LSAB – anti-camundongo, anti-coelho e anti-cabra (Dako)

3.9 Protocolo de citometria de fluxo para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1

Os experimentos envolvendo a produção de citocinas em células THP-1 mediada pela infecção com BCG/*sm14* e os BCGs controles foram realizados como descrito no item 3.5. Nas amostras onde a infecção ocorreu por 24 horas e 48 horas foram adicionadas 1 μ L de brefeldina A (BD Biosciences / Becton Dickinson & Company, San Diego, EUA) 4 horas antes do término de cada tempo de infecção, atuando na inibição do complexo de Golgi por este ser o principal centro de distribuição da célula, visando o acúmulo de citocina no interior da célula.

As amostras foram ressuspensas em 50 μ L da solução *Cytofix/Cytoperm* (BD Biosciences), homogeneizadas no agitador de tubos (Fanem) e incubadas por 20 minutos em gelo. Em seguida foram adicionados 150 μ L de PBS, as amostras foram centrifugadas por 10 segundos a 6500 x *g* e ressuspensas em 200 μ L tampão *Perm/Wash* 1X (BD Biosciences) adicionado com 10% (v/v) de soro AB humano (Sigma-Aldrich). Os anticorpos (Tabela 3.2) diluídos no tampão *Perm/Wash* adicionado com 10% (v/v) de soro AB humano foram adicionados as amostras e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram lavadas uma vez com 400 μ L de *Perm/Wash* e uma vez com 400 μ L PBS.

A leitura das amostras foi realizada no citômetro Coulter EPICS XL-MCL (Beckman Coulter, Fullerton, EUA), utilizando o filtro *Band Pass* (BP) de 525 nm para a leitura dos anticorpos marcados com fluorocromo Ficoeritrina (PE) e o filtro BP de 575 nm para leitura do anticorpo marcado com fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Tabela 3.3) e analisadas no programa WinMDI versão 2.8. A seleção da região de interesse (R1) foi realizada em gráficos de distribuição em pontos de tamanho celular relativo (*Foward angle light scatter* - FSC) versus granulosidade celular (*Side angle light scatter* - SSC), de onde foram excluídos tanto restos como grumos celulares, sendo analisado um mínimo de 20 mil eventos por amostra.

Tabela 3.3: Anticorpos utilizados no protocolo de citometria de fluxo

Anticorpo Primário	Origem	Diluição	Empresa	Fluorocromo	Filtros (Band Pass)
anti-IL-10 humana	Rato	1:200	BD Biosciences	PE	575 nm
anti-IL-12 (p70) humana	Camundongo	1:200	BD Biosciences	PE	575 nm
anti-TNF- α humana	Camundongo	1:800	BD Biosciences	FITC	525 nm

4. RESULTADOS

4.1 Cultivo da célula THP-1

Para a padronização da manipulação da célula THP-1 foram determinados parâmetros para o meio de cultivo e manutenção.

4.1.1 Meios de cultivo.

Foram testados, diversos meios de cultura (MEM, D-MEM e RPMI 1640) e suplementos (SFB, HEPES, L-glutamina, NaHCO_3 , 2-mercaptoetanol, piruvato de sódio, estreptomicina/penicilina, gentamicina) e após observação morfológica das células por microscopia óptica (400 x), definiu-se que para os experimentos propostos seria utilizado o meio de cultura RPMI preparado com 0,2% (v/v) de NaHCO_3 , sendo suplementado com SFB nas concentrações de 20% para o descongelamento e 10% para a manutenção e experimentos. O uso de outros suplementos de crescimento como piruvato de sódio e 2-mercaptoetanol não se mostraram necessários (dados não mostrados).

4.1.2 Manutenção

A manutenção da célula THP-1 foi realizada a cada 3-4 dias, contudo, foi estipulado após observação morfológica, que os experimentos seriam realizados com células que estivessem na terceira ou quarta passagem (Figura 4.1). Da mesma forma, para a criação dos lotes de trabalho e reposição do acervo, as células THP-1 seriam mantidas até a oitava passagem.

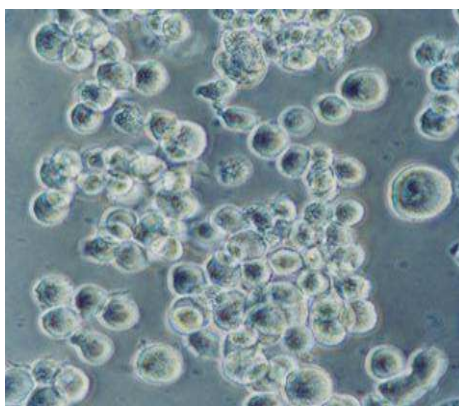


Figura 4.1 Microscopia óptica (200 x) de células THP-1, após três passagens, mantidas em meio RPMI 1640 preparado com 0,2% de NaHCO_3 e suplementado com 10% de SFB.

4.2. Cultivo das cepas de BCG

Para o cultivo das cepas BCG-P, BCG/pAU5 e BCG/sm14 foi utilizado a metodologia usualmente aplicada no LATER (Medeiros 2001, Santos 2002, Argondizzo 2005). Entretanto devido à dificuldade para a determinação da viabilidade dos BCGs em UFC utilizando o meio Middlebrook 7H10 (Difco) suplementado com 10% (v/v) de ADC preparado no laboratório, buscaram-se diferentes alternativas, como a substituição do lote do meio Middlebrook 7H10, utilização do meio Middlebrook 7H11 e suplementação dos meios com ADC e OADC comercial (Difco).

A quantificação dos BCGs obtida, em UFC, após o plaqueamento em diferentes formulações dos meios Middlebrook 7H10 e 7H11, foi confrontada com a quantificação das amostras em hemocitômetro e no ajuste ao padrão 1 do sistema de McFarland. Os resultados demonstraram que os BCGs cultivados em meio Middlebrook 7H11 preparado com 0,2% de glicerol e suplementado com 10% de OADC (Figura 4.2) obtiveram a mesma quantidade de UFC que as amostras ajustadas ao padrão 1 do sistema de McFarland e quantificadas em hemocitômetro.

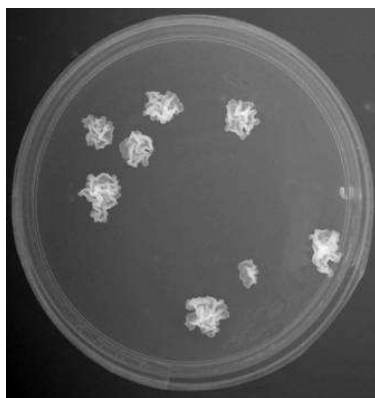


Figura 4.2 Cultura de *M. bovis* BCG Pasteur em meio 7H11 suplementado com 10% de OADC.

4.3 Expressão da proteína Sm14 pelo BCG/*sm14*

A técnica de *Western blot* foi empregada para avaliar a expressão da proteína Sm14 pelos quatro clones da construção BCG/*sm14* utilizados nos experimentos de infecção em células THP-1.

Foi utilizada como padrão (P), 20 ng da proteína Sm14r produzida em *E.coli*, gentilmente cedida pela Dr^a. Miriam Tendler (Laboratório de Esquistossomose Experimental – IOC/Fiocruz) onde em virtude do aquecimento observam-se duas bandas, referentes à proteína Sm14r e seu dímero. Nas linhas 1 a 4 foram aplicados como controle, amostras de 4 clones de BCG/pAU5, onde se observam bandas inespecíficas. Nas linhas 5 a 8 foram aplicadas amostras de 4 clones de BCG/*sm14*, destacando-se em vermelho as bandas correspondentes a proteína Sm14r produzida em BCG, sendo visualizado também o dímero dessa proteína (Figura 4.3).

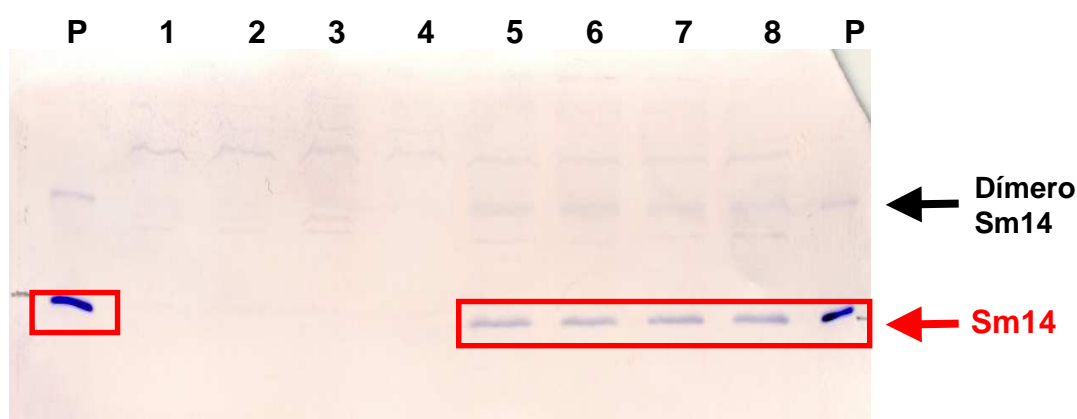


Figura 4.3 Expressão da proteína Sm14 produzida pelos quatro clones de BCG/*sm14* utilizados nos experimentos de infecção (linhas 5-8). Como controle foram usados 20 ng da proteína Sm14 (indicada pela letra P) e as proteínas totais dos quatro clones de BCG/pAU5 utilizados nos experimentos de infecção (linhas de 1-4).

4.4 Multiplicidade de infecção (MOI) BCG:THP-1

Para a determinação da melhor relação micobactéria-célula THP-1 a ser utilizada para se testar os BCG recombinantes, foi utilizada a quantificação da expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α , após 4 e 24 horas de infecção pela técnica de citometria de fluxo. Foi realizado um experimento onde foram testadas três relações micobactéria-célula THP-1: 5, 10 e 50 células de BCG-P para cada célula THP-1. Os resultados evidenciados e demonstrados na figura 4.4, indicam

que um percentual pequeno de células THP-1, mesmo sem estímulos, é capaz de secretar essas citocinas em nível basal (2,9%, 5,3%, 3,0% para IL-10, IL-12 e TNF- α , respectivamente). Estes percentuais permanecem estáveis após 4 horas de infecção com o BCG-P. Entretanto, após 24 horas de infecção com BCG-P, o percentual de células secretando IL-10 foi de 4,8%, 13,4% e 5,7% quando infectadas respectivamente por 5, 10 e 50 micobactérias-célula THP-1, indicando que para esta citocina a melhor relação micobactéria-célula THP-1 é de 10:1 (Figura 4.2). Para IL-12 foi possível observar que 4,8%; 12,7% e 6,1% das células infectadas expressavam esta citocina em resposta à mesma relação micobactéria-célula THP-1. Contudo, observamos um perfil diferente quanto à secreção de TNF- α , 10,5%, 5,97% e 4,23%, indicando que a melhor dose resposta foi obtida com a relação de 5 micobactérias-célula THP-1.

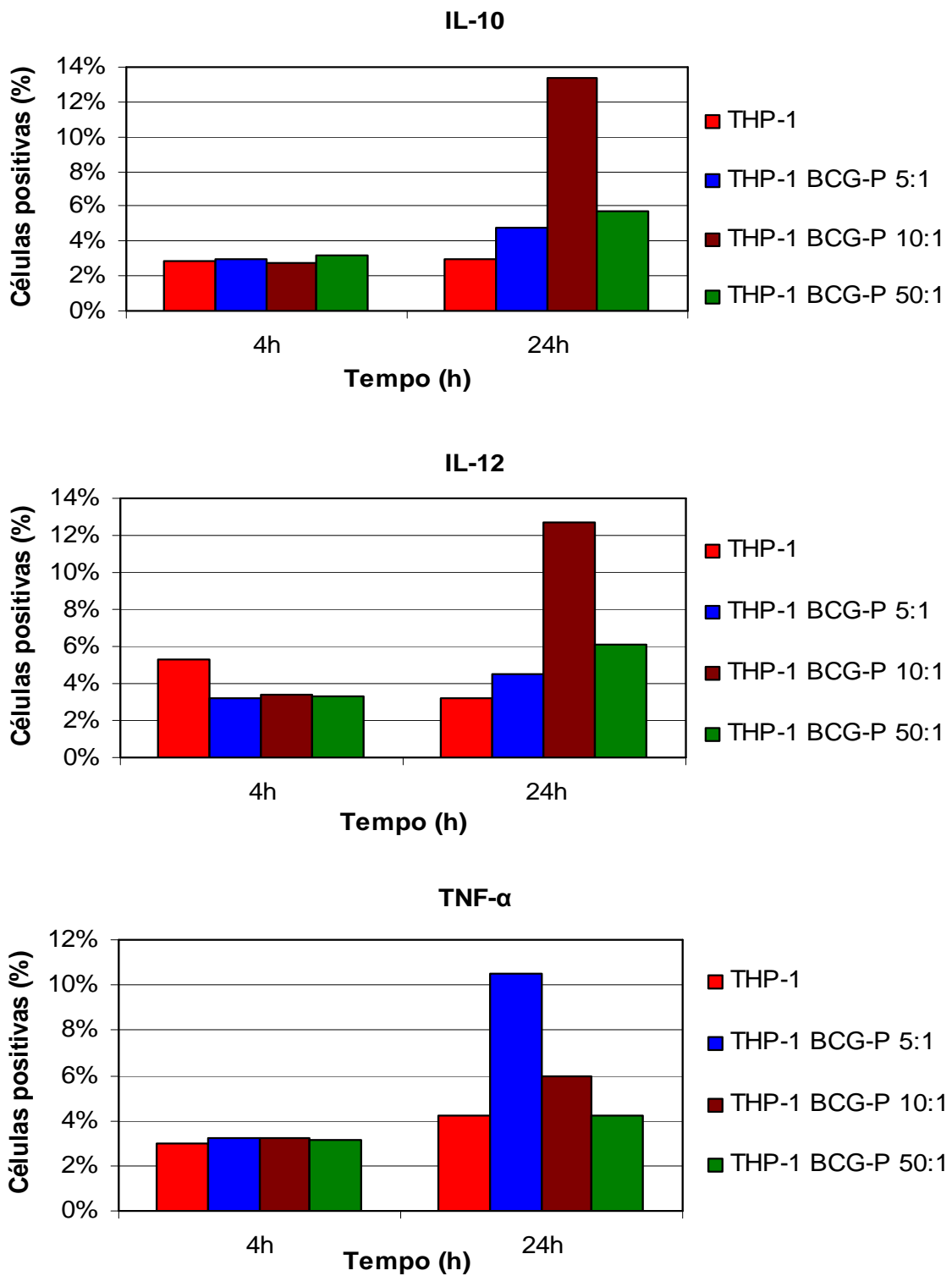


Figura 4.4. Expressão de IL-10, IL-12 e TNF- α em células THP-1 infectadas com *M. bovis* BCG sub-cepa Pasteur 1173P2 utilizando diferentes relações micobactéria-célula.

4.5 Capacidade de proliferação da célula THP-1 infectada pelo BCG/*sm14* e BCGs controles

A avaliação da capacidade de replicação das células THP-1 infectadas ou não pelo BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5) foi realizada pela técnica de proliferação celular através da absorção de timidina tritiada (cintilação). Os resultados obtidos em um experimento demonstram que as células THP-1 tiveram seu crescimento celular reduzido em mais de dois \log_{10} , 24 e 48 horas após a infecção com o BCG/*sm14* e os BCGs controles, não havendo diferença entre os BCGs. Os resultados indicam que a linhagem monocítica THP-1 tem sua diferenciação celular interrompida após infecção com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (Figura 4.5).

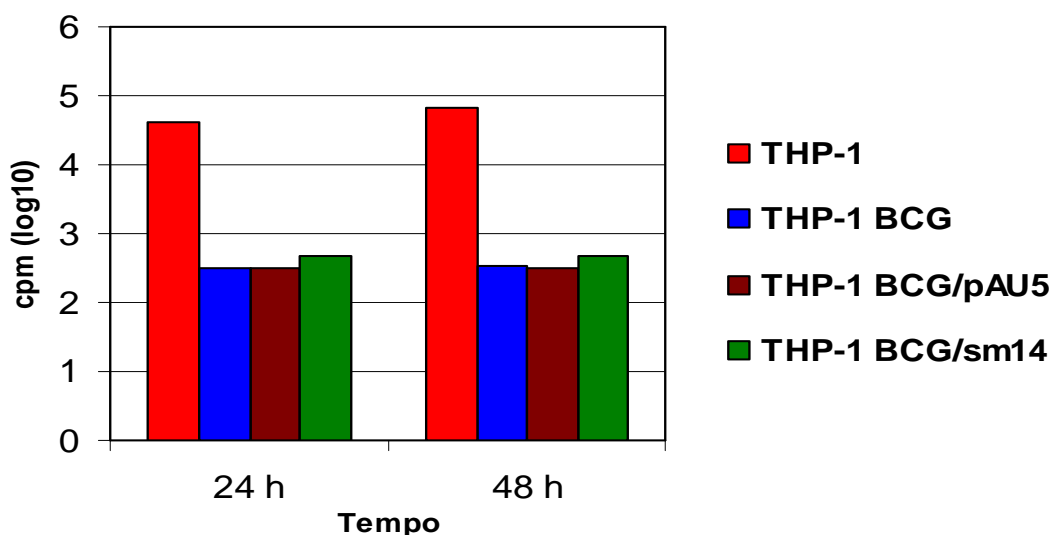


Figura 4.5: Atividade proliferativa das células THP-1 infectadas pelo BCG/*sm14* e pelos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5). Os resultados estão expressos em contagem por minuto (cpm).

4.6 Avaliação da viabilidade e estabilidade funcional (expressão do gene *kanR*) dos BCG/*sm14* e BCGs controles recuperados das células THP-1

A capacidade de infecção e manutenção do crescimento intracelular dos BCGs foi realizada em paralelo aos três experimentos de infecção com as cepas de BCG em células THP-1. A determinação comparativa das UFC dos cultivados em meio 7H11 seletivo (com canamicina – 7H11/Kan) e meio 7H11 não seletivo, permitiu avaliar a estabilidade funcional dos BCGs recombinantes (Figura 4.6).

Foi possível observar que de 3 a 7,5% dos BCGs não foram capazes de penetrar ou permanecerem aderidos a membrana das células THP-1, pois após 4 horas de infecção houve uma redução no número de bacilos utilizados para a infecção (tempo 0). Praticamente não houve diferença entre o número de bacilos recuperados entre o BCG/*sm14* e os BCGs controles, indicando que a presença do plasmídeo não alterou a capacidade dos BCGs recombinantes de penetrarem na célula.

Da mesma forma não observamos diferença entre os BCG/*sm14*, BCG-P e BCG/pAU5 quanto a capacidade de multiplicação intracelular, visto a manutenção entre o número de UFC recuperadas após 24 horas ($5,4 \log_{10}$, $5,7 \log_{10}$ e $5,4 \log_{10}$) e 48 horas ($5,3 \log_{10}$, $5,6 \log_{10}$ e $5,2 \log_{10}$). Uma redução entre 0,1 e $0,3 \log_{10}$ foi observada entre o período basal de 4 horas e após 24 e 48 horas.

Na avaliação da estabilidade funcional dos BCGs recombinantes, observamos que não houve diferença expressiva entre o cultivo dos BCG/*sm14* e BCG/pAU5 nos meios Middlebrook 7H11 e 7H11/Kan em todos os tempos avaliados. Como controle do meio seletivo, foram plaqueadas amostras de BCG, não sendo observado nenhum crescimento.

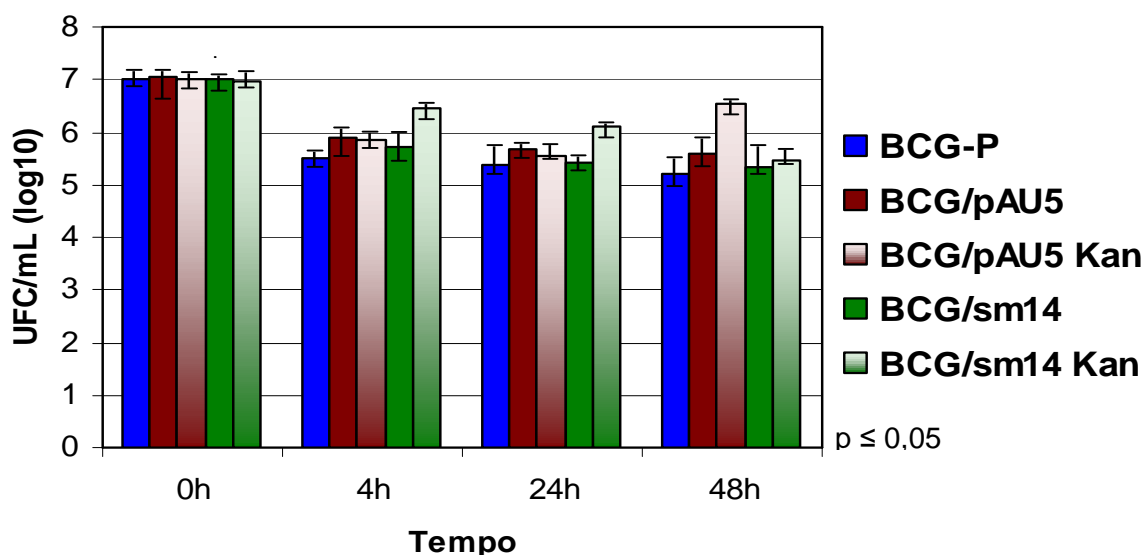


Figura 4.6 Gráfico da cinética da viabilidade do protótipo vacinal BCG/sm14 e dos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), recuperados de células THP-1 e cultivados nos meios Middlebrook 7H11 e 7H11/Kan (Três experimentos em triplicata).

4.7. Avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção do BCG/sm14 e BCGs controles em células THP-1 por imunocitoquímica

Para a detecção intracelular das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α produzidas pela infecção com BCG/sm14, BCG-P e BCG/pAU5 nas células THP-1 pela técnica de imunocitoquímica, com base na dissertação da Msc. Ana Teresa Gomes Fernandes (Fernandes 2003). Devido às dificuldades de adaptação deste procedimento à técnica de imunocitoquímica, foram avaliados diferentes parâmetros como condições de incubação dos anticorpos primários (1 hora a 25°C ou *overnight* a 4°C), tampões (HBSS, TBS-T, PBS-Saponina) e fixadores (paraformaldeído 4% ou acetona PA). Após observação morfológica por microscopia óptica (1000 x), determinou-se que os anticorpos primários deveriam ser incubados com as amostras a 4°C por 16-18 horas (*overnight*), sendo utilizado o tampão TBS-T e as amostras fixadas com paraformaldeído 4%.

Foi possível identificar por esta metodologia a produção de citocinas pelas células THP-1 (Figura 4.7). O percentual de células expressando cada citocina foi determinado após 4, 24 e 48 horas de infecção pelo BCG-P, BCG/pAU5 e BCG/sm14 através da média de três experimentos, sendo demonstrado o desvio padrão pela barra de erro. A expressão basal destas citocinas foi também determinada em células não infectadas, onde se observou que a citocina IL-10 foi

expressa por 5,0%, 10,7% e 6,4% das células THP-1, sendo que 8,8%, 8,2% e 3,4% produziram IL-12 e 3,6%, 6,5% e 2,2% expressaram TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente. Após a infecção com BCG-P, 5,9%, 6,5% e 5,5% expressavam IL-10; 9,45%, 4,6% e 6,1% expressaram IL-12 e 6,8%, 6,4% e 5,2% TNF- α , durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente. Na infecção de células THP-1 com o recombinante controle BCG/pAU5, 7,3%, 9,9% e 2,9% expressaram IL-10, na produção de IL-12 foram observados 9,9%, 8,3% e 7,1% de células e 4,1%, 5,5% e 1,5% de células produziram TNF- α . Durante a infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, foram detectadas 5,3%, 9,3% e 6,2% de células expressando IL-10; 9,4%, 10,4% e 4,3% de células produtoras de IL-12 e 4,5%; 7,1% e 6,0% de células fabricantes de TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente (Figura 4.7).

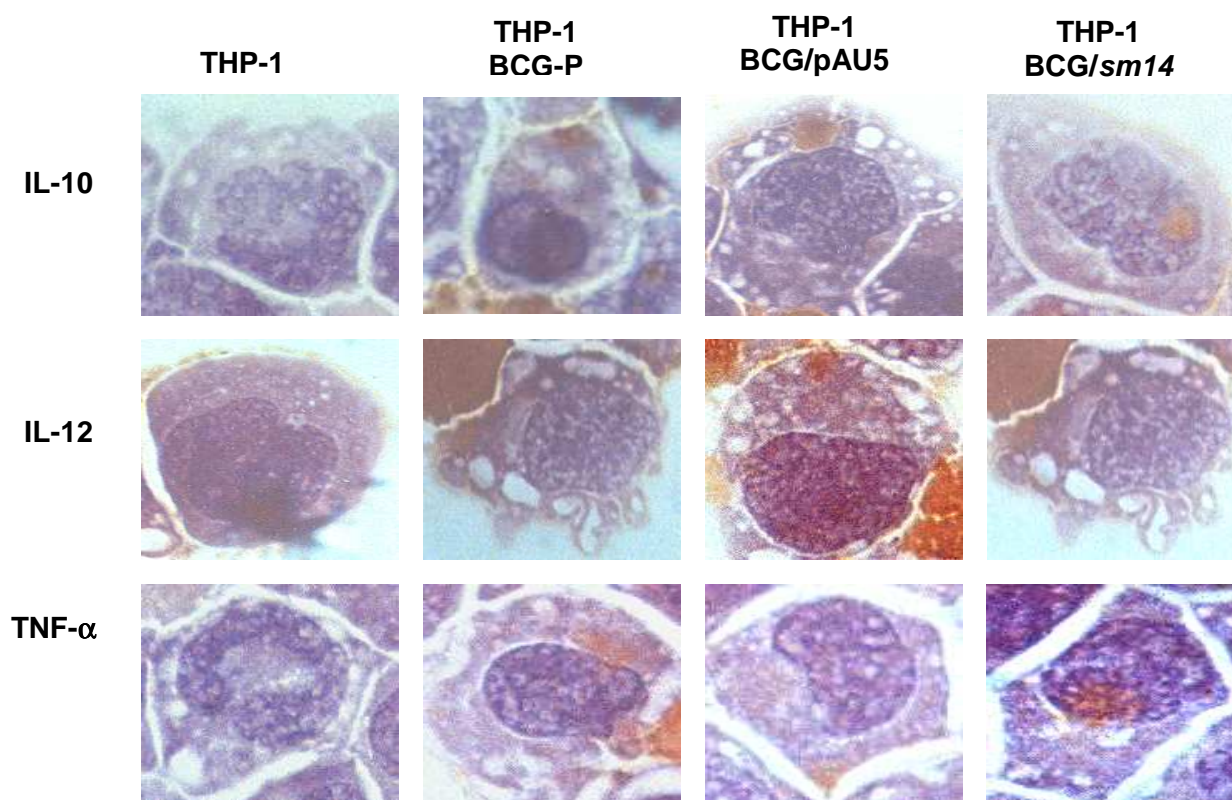


Figura 4.7 Microscopia óptica (1000 x) de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após 24 horas de infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), detectadas por imunocitoquímica.

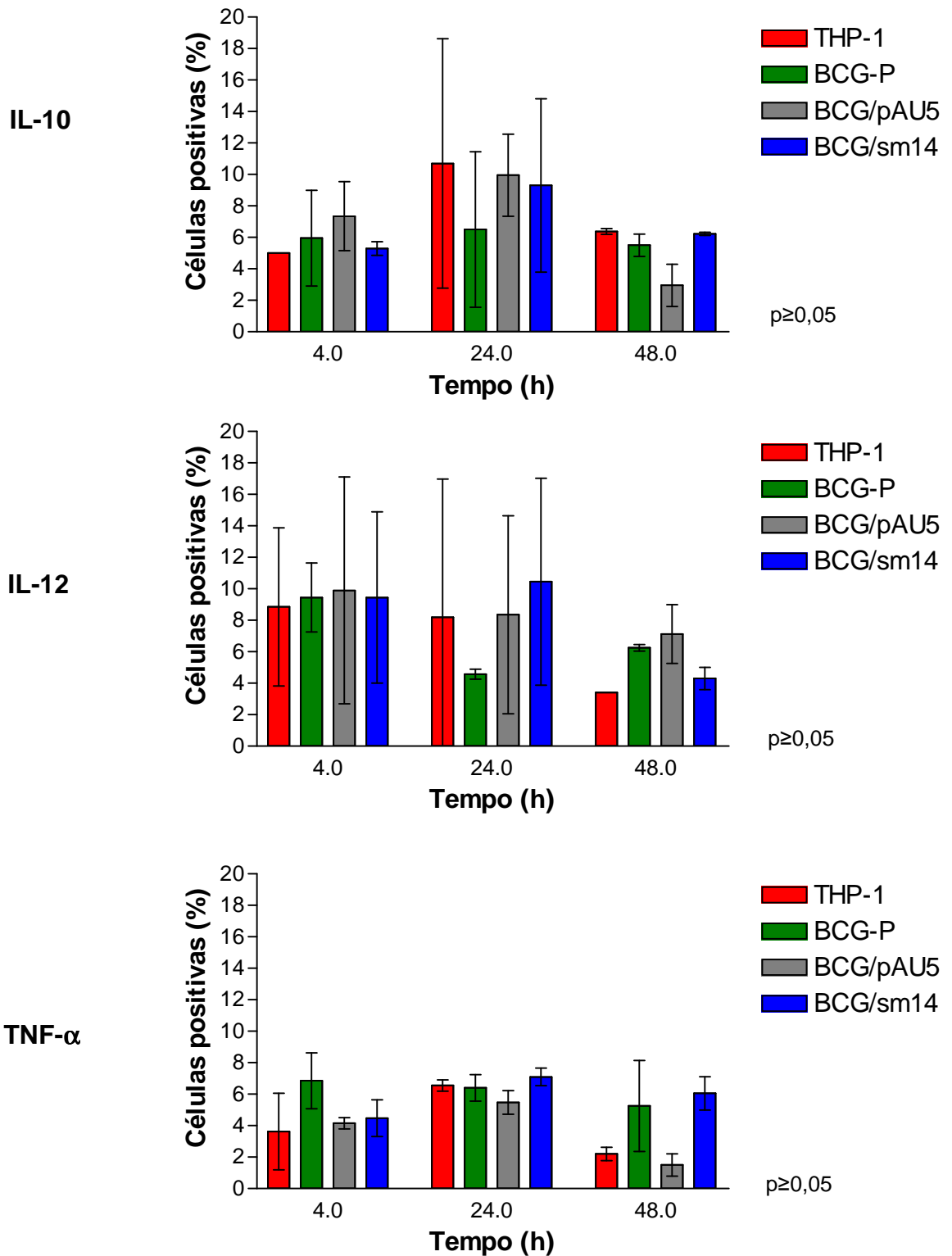


Figura 4.8 Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por imunocitoquímica (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

4.8 Avaliação das citocinas a partir da infecção do BCG/*sm14* e BCGs controles em células THP-1 por Citometria de Fluxo

Para a detecção intracelular das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α produzidas pela célula THP-1 e pela infecção com BCG/*sm14*, BCG-P ou BCG/pAU5 em células THP-1 pela técnica de citometria de fluxo, inicialmente foi determinada a região de análise a partir da leitura de uma amostra das células THP-1 incubada a 37°C em ambiente com 5% CO₂ por 4 horas, sendo comparada a relação tamanho/granulosidade, objetivando excluir tanto restos celulares quanto grumos celulares (Figura 4.8).

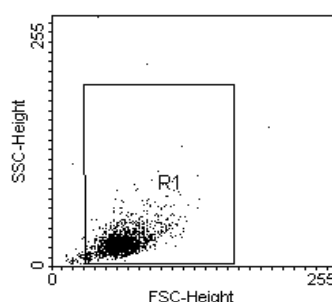


Figura 4.9 Determinação da região de análise das células THP-1 mantidas em cultivo celular. A região de análise (R1) foi determinada excluindo-se os restos celulares. Pode-se observar uma grande variabilidade quanto ao tamanho das células, visto se tratar de células em diferenciação.

Os resultados estão expressos nas figuras 4.9 a 4.12, mostrando a média de três experimentos, sendo evidenciado o desvio padrão pela barra de erro. Na detecção da produção de citocinas pelas células THP-1 sem estímulos, observou-se que a citocina IL-10 foi expressa por 3,2%, 8,1% e 11,4% das células THP-1, sendo que 2,7%, 4,6% e 8,1% das células THP-1 produziram a citocina IL-12 e 3,0%, 5,9% e 5,4% das células THP-1 expressaram TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas.

A infecção com BCG-P em células THP-1 gerou durante os tempos de infecção, 3,3%, 6,9% e 13,4% de células produtoras de IL-10; 2,0%, 5,5% e 12,0% de células expressando IL-12 e 4,2%, 5,4% e 11,4% de células sintetizando TNF- α .

Na infecção com o controle BCG/pAU5 em células THP-1, 3,3%, 6,2% e 12,3% expressaram IL-10, na produção de IL-12 foram detectados 4,3%, 4,6% e 10,2% de células e 4,0%, 3,9% e 11,3% de células produziram TNF- α .

Durante a infecção do BCG/*sm14* em células THP-1, foram detectados 3,2%, 7,9% e 12,9% de células expressando IL-10; 3,1%, 4,8% e 9,0% de células produtoras de IL-12 e 2,7%, 3,4% e 11,4% de células fabricantes de TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente.

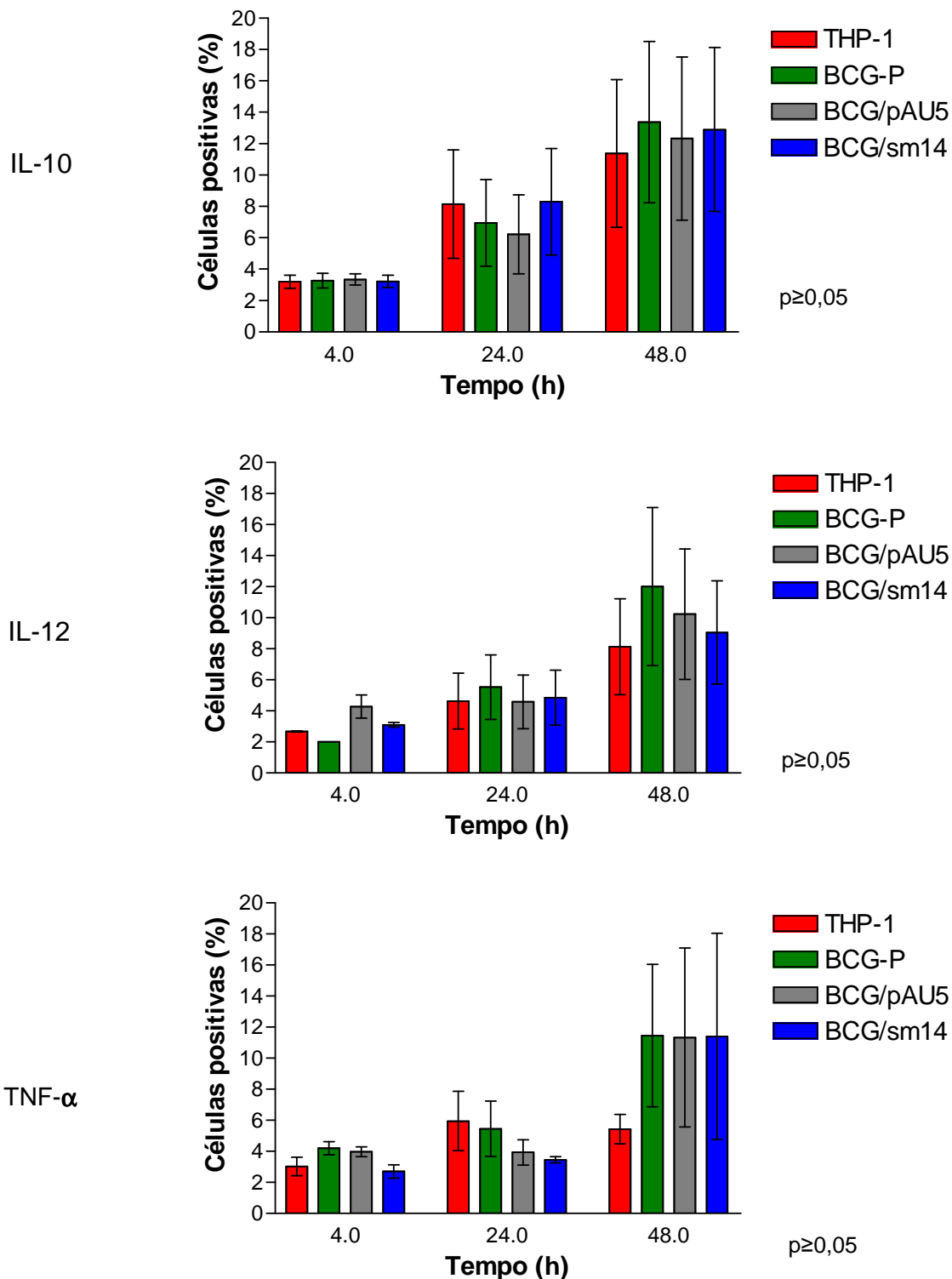


Figura 4.10: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 TNF- α e após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por citometria (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

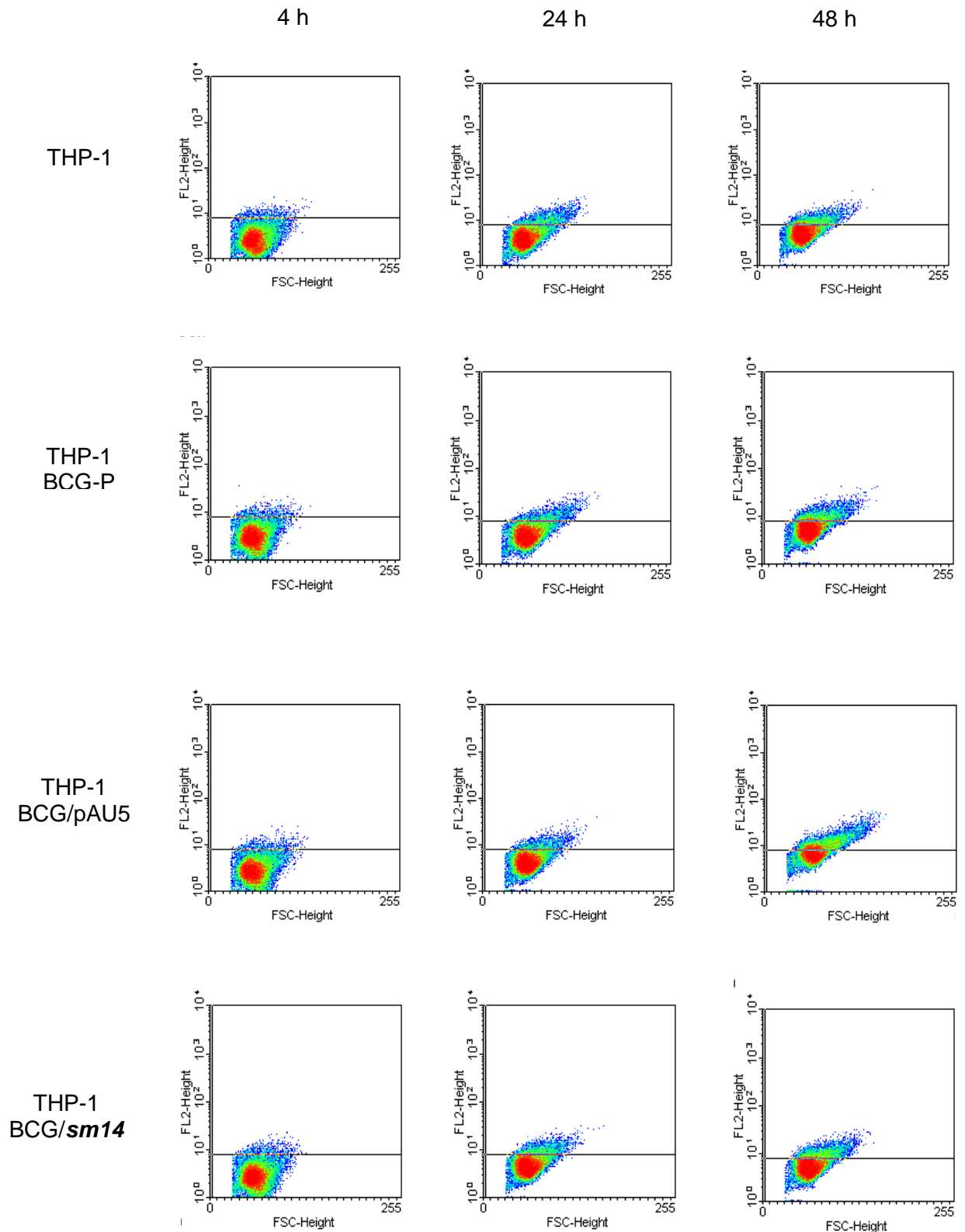


Figura 4.11: Gráfico tamanho (FSC) *versus* fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria (Experimento III).

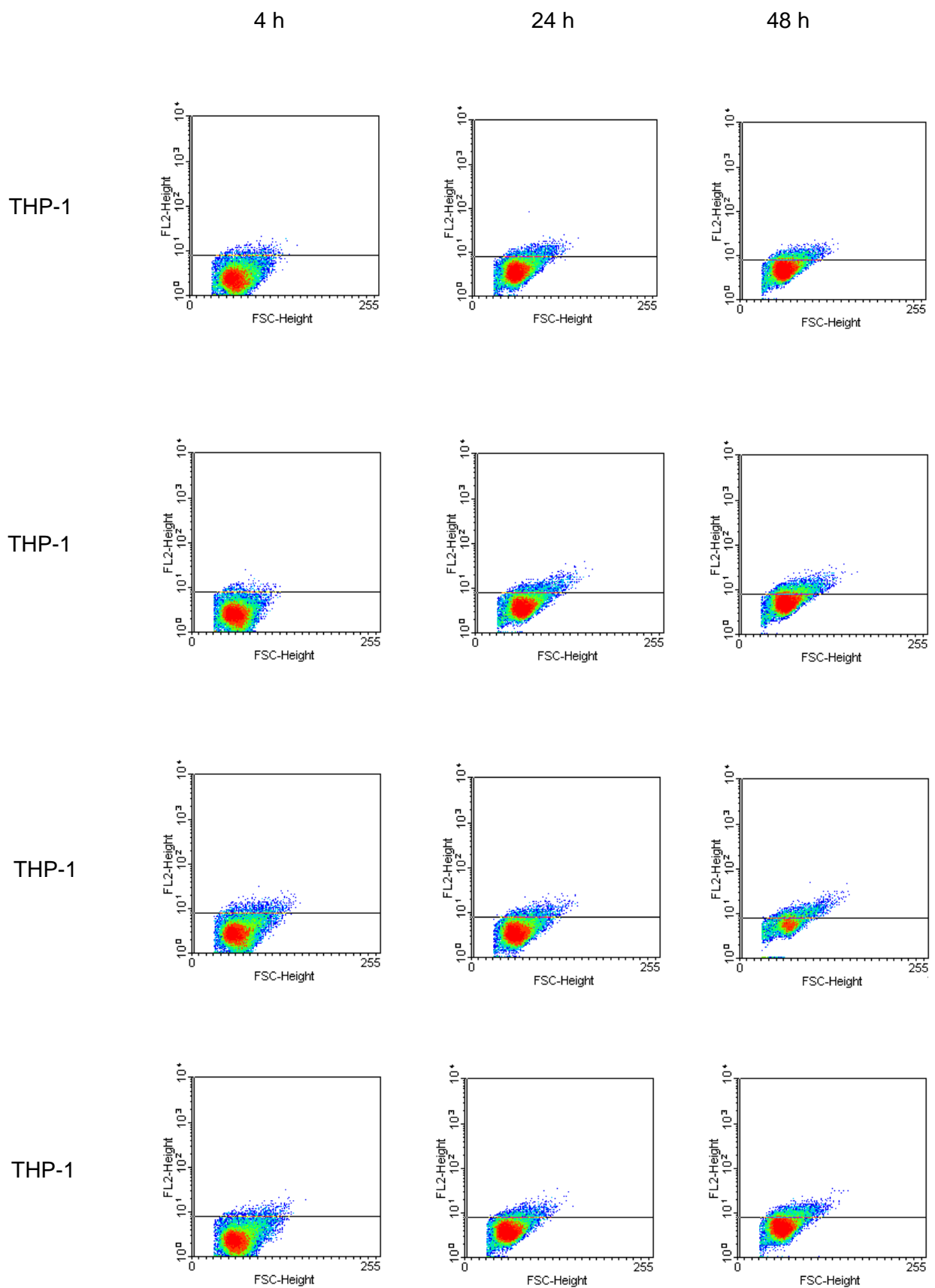


Figura 4.12: Gráfico tamanho (FSC) versus fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/sm14 e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por citometria (Experimento III).

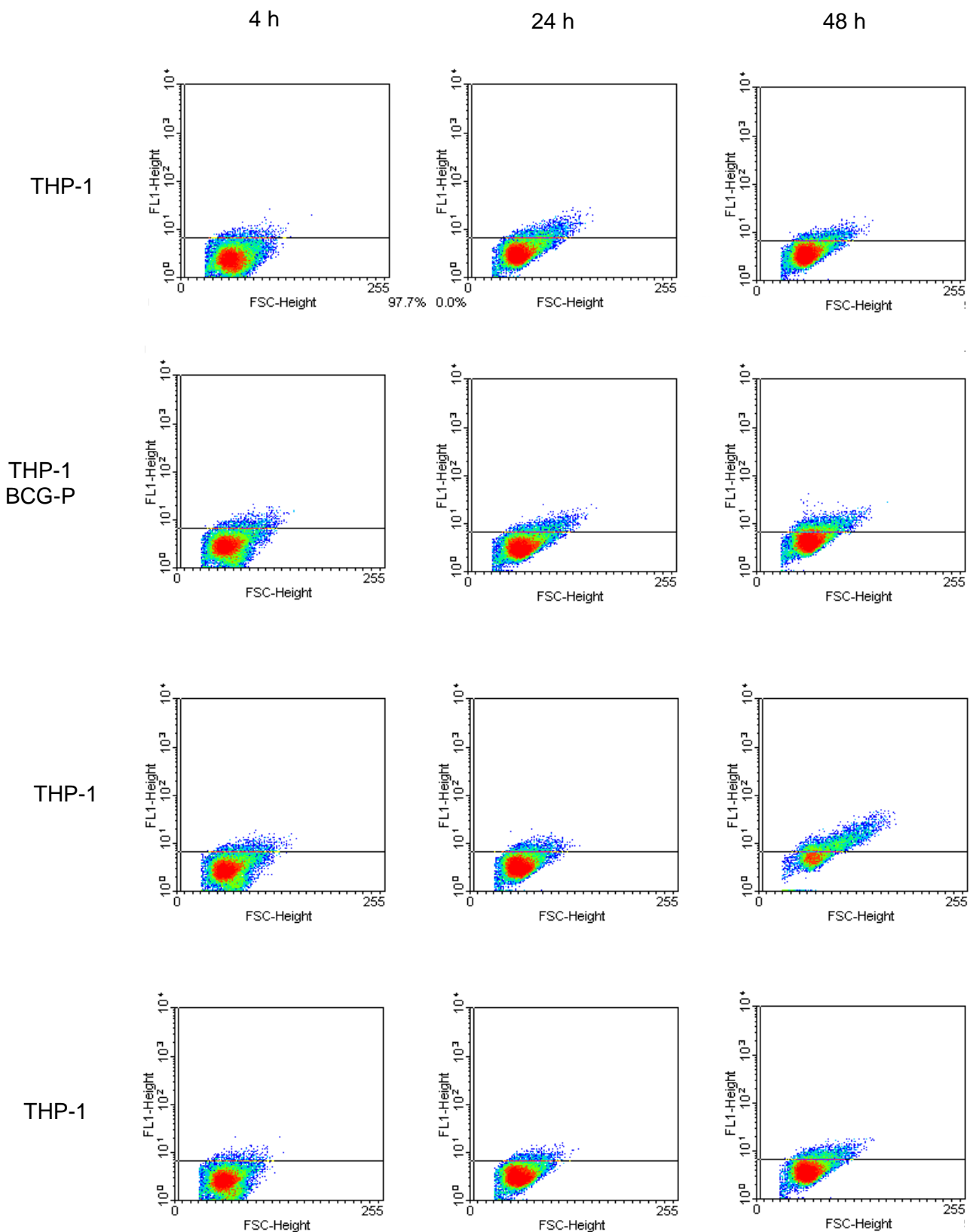


Figura 4.13: Gráfico tamanho (FSC) *versus* fluorescência (FL1 ou FL2) da avaliação de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por citometria (Experimento III).

4.9 Comparação entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo

As células THP-1 infectadas ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles foram avaliadas quanto à produção das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α durante os períodos de 4, 24 e 48 horas, pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo.

4.9.1 Detecção de IL-10

A detecção de células THP-1 produtoras de IL-10 a partir da infecção ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), estão apresentadas na figura 4.13. Nas células THP-1 não infectadas, observa-se uma variação entre 1,8% e 2,6% de células positivas na avaliação pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo nos tempos de 4 horas (5,0% e 3,2%, respectivamente) e 24 horas (8,1% e 10,7%, respectivamente), ocorrendo uma inversão na variação do número de células produtoras de IL-10, no período de 48 horas (6,4% e 11,4%, respectivamente).

Na infecção com BCG-P em células THP-1 revela-se que no período de 4 horas há variação do número de células positivas detectadas pelas duas técnicas (5,9% imunocitoquímica e 2,0% citometria). Já nos períodos de 24 e 48 horas evidencia-se uma variação de 1,0% (5,5% e 6,5%, respectivamente), sendo observado de forma similar às células THP-1 uma inversão entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (5,5% e 12,0%, respectivamente).

Na infecção com BCG/pAU5 em células THP-1 avista-se uma variação de 4,0% do número de células positivas (7,3% e 3,3%, respectivamente) em 4 horas de infecção. No tempo de 24 horas, mantém-se a variação (9,9% e 6,2% respectivamente). No entanto, no tempo de 48 horas de infecção, a porcentagem de células expressando IL-10 detectada pela técnica de imunocitoquímica diminui para 2,9% enquanto pela técnica de citometria de fluxo, aumenta praticamente quatro vezes em relação à porcentagem observada no tempo de 24 horas (12,3%).

Na infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, nos tempos de 4, 24 e 48 horas, avalia-se inicialmente uma variação de 2,1% na detecção de IL-10 pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (5,3% e 3,2%, respectivamente) no tempo de 4 horas. No tempo de 24 horas visualizamos uma pequena queda na variação dos valores obtidos entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria

(9,3% e 7,9% respectivamente). observa-se uma inversão do número de células positivas no tempo de 48 horas (6,2% e 12,9% respectivamente).

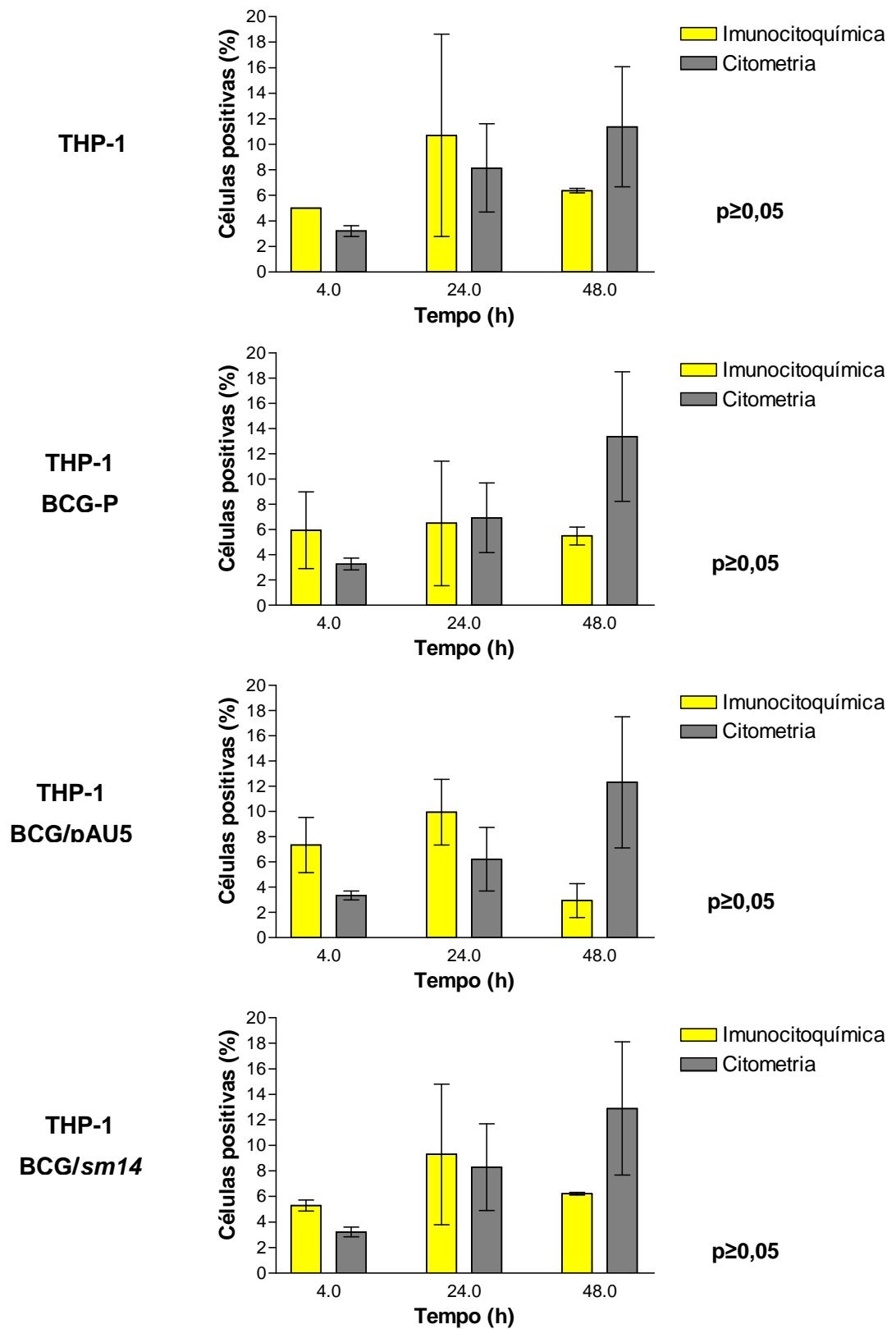


Figura 4.14: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por imunocytoquímica e citometria de fluxo (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

4.9.2 Detecção de IL-12

A detecção de células THP-1 produtoras de IL-12 a partir da infecção ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), estão apresentadas na figura 4.14. Nas células THP-1 não infectadas, observa-se uma variação na detecção de células positivas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (8,8% e 2,7%, respectivamente). No período de 24 horas, mantém-se praticamente inalterado o número de células produtoras de IL-12 avaliado pela técnica de imunocitoquímica (8,2%) e um aumento na porcentagem de células positivas avaliados pela técnica de citometria de fluxo (4,6%). No tempo de 48 horas as porcentagens de células THP-1 positivas foram de 3,4% e 8,1% nas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

Na infecção com BCG em células THP-1 revela-se que no período de 4 horas, os valores obtidos foram de 9,4% e 2,0% de células positivas identificadas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria, respectivamente. No período de 24 horas evidencia-se um decréscimo de 4,8% de células avaliadas pela técnica de imunocitoquímica (4,6%) e um aumento de 3,5% de células avaliadas pela técnica de citometria de fluxo. A mesma tendência de inversão na variação dos valores obtidos pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria no tempo de 48 horas após infecção é evidenciado (6,1% e 12,0%, respectivamente).

Na infecção com BCG/pAU5 em células THP-1 avista-se uma variação do número de células positivas detectadas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria no tempo de 4 horas (9,9% e 4,3%). Após 24 horas de infecção, ocorre uma diminuição de 1,6% do número de células positivas determinadas pela técnica de imunocitoquímica e aumento de 0,3% de células positivas avaliadas pela técnica de citometria. Já no tempo de 48 horas de infecção, a porcentagem de células expressando IL-12 detectada pela técnica de imunocitoquímica diminuiu para 7,1% e pela técnica de citometria de fluxo a porcentagem de células positivas aumentou para 10,2%.

Na infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, observa-se uma variação de mais de 6,0% na detecção de IL-12 pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (9,4% e 3,1%, respectivamente) no tempo de 4 horas. No tempo de 24 horas há um aumento de 1,0% no número de células positivas detectadas pela técnica de imunocitoquímica (10,4%) semelhante ao aumento de 1,7% detectado pela técnica de citometria de fluxo (4,8%). Em 48 horas de infecção, foram

detectados 4,3% e 9,0% de células produtoras de IL-10 pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

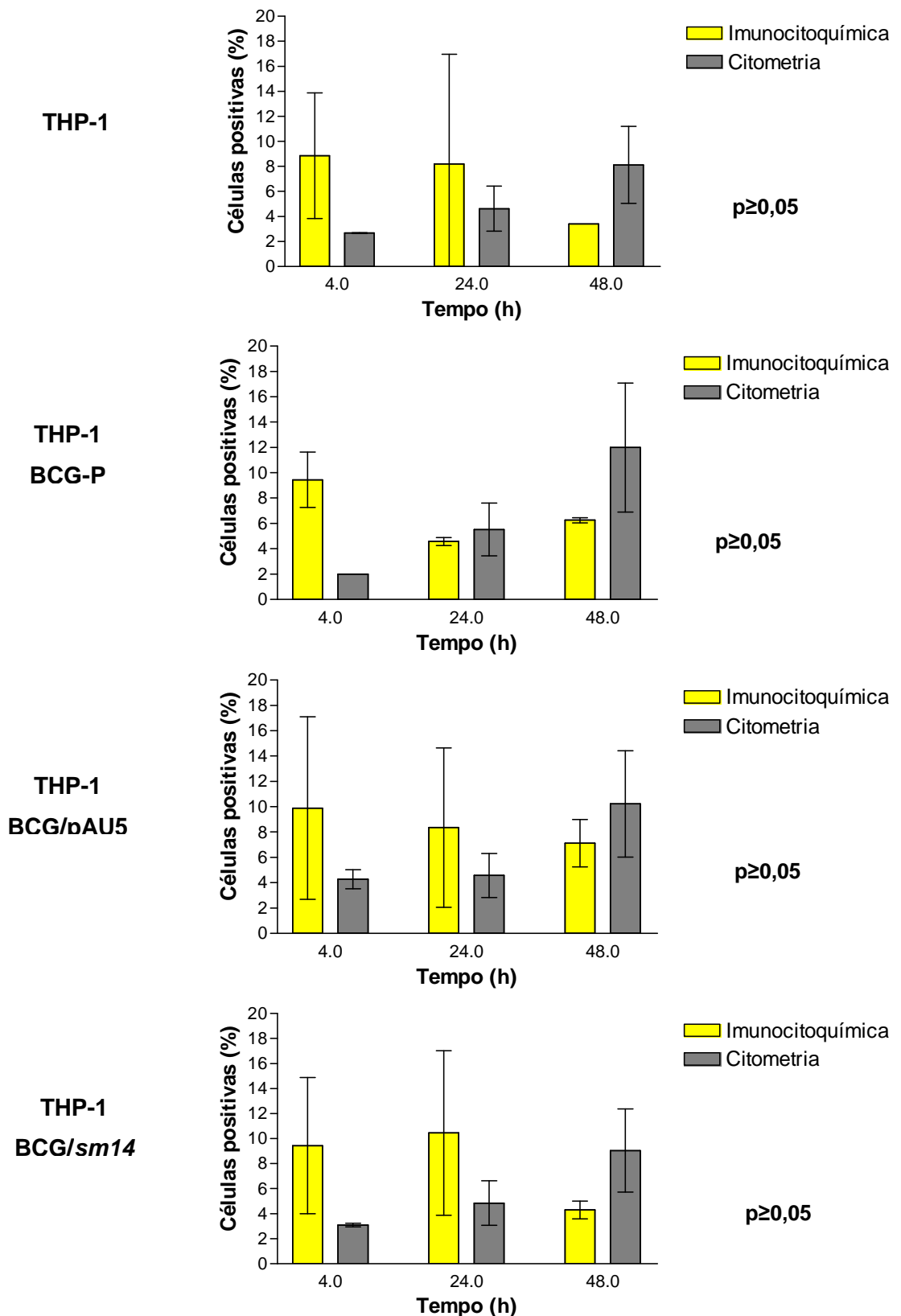


Figura 4.15: Percentagem de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

4.9.3 Detecção de TNF- α

A detecção de células THP-1 produtoras de TNF- α a partir da infecção ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), estão apresentadas na figura 4.15. Nas células THP-1 não infectadas, detecta-se no período de 4 horas os valores de 3,6% e 3,0% de células positivas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente. No tempo de 24 horas, ocorre um aumento do número de células produtoras de IL-12 avaliado tanto pela técnica de imunocitoquímica (6,5%) como pela técnica de citometria de fluxo (5,9%). No tempo de 48 horas as porcentagens de células THP-1 positivas foram de 2,2% e 5,4% nas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

Na infecção com BCG em células THP-1 revela-se que no período de 4 horas os valores detectados de células positivas pelas duas técnicas foram de 6,8% pela técnica de imunocitoquímica e 3,0% pela técnica de citometria de fluxo. Já nos períodos de 24 e 48 horas evidenciam-se 6,4% e 5,2%, respectivamente, de células positivas na leitura pela técnica de imunocitoquímica. Nesses mesmos períodos, os valores da leitura pela técnica de citometria de fluxo os valores de células produtoras de TNF- α foram semelhantes (5,9% e 5,4% respectivamente).

Na infecção com BCG/pAU5 em células THP-1 avistam-se os valores de 4,1% e 4,0% de células positivas em 4 horas de infecção pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente. No tempo de 24 horas, há um aumento do número de células expressando TNF- α detectadas pela técnica de imunocitoquímica enquanto pela citometria de fluxo o valor de células positivas mantém-se inalterado (5,5% e 3,9%, respectivamente). Já no tempo de 48 horas de infecção, a porcentagem de células expressando TNF- α detectada pela técnica de imunocitoquímica diminui para 1,5% e na técnica de citometria de fluxo aumenta consideravelmente em relação à porcentagem observada nos tempos de 4 e 24 horas (11,3%).

Na infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, nos tempos de 4, 24 e 48 horas, observa-se inicialmente os valores de 4,5% e 3,1% de células produtoras de TNF- α identificadas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo no tempo de 4 horas de infecção. No tempo de 24 horas há um aumento de células positivas detectadas em ambas as técnicas (7,1% e 4,8% respectivamente). Em 48 horas de infecção, foram detectadas 6,0% e 9,0% de células produtoras de TNF- α pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

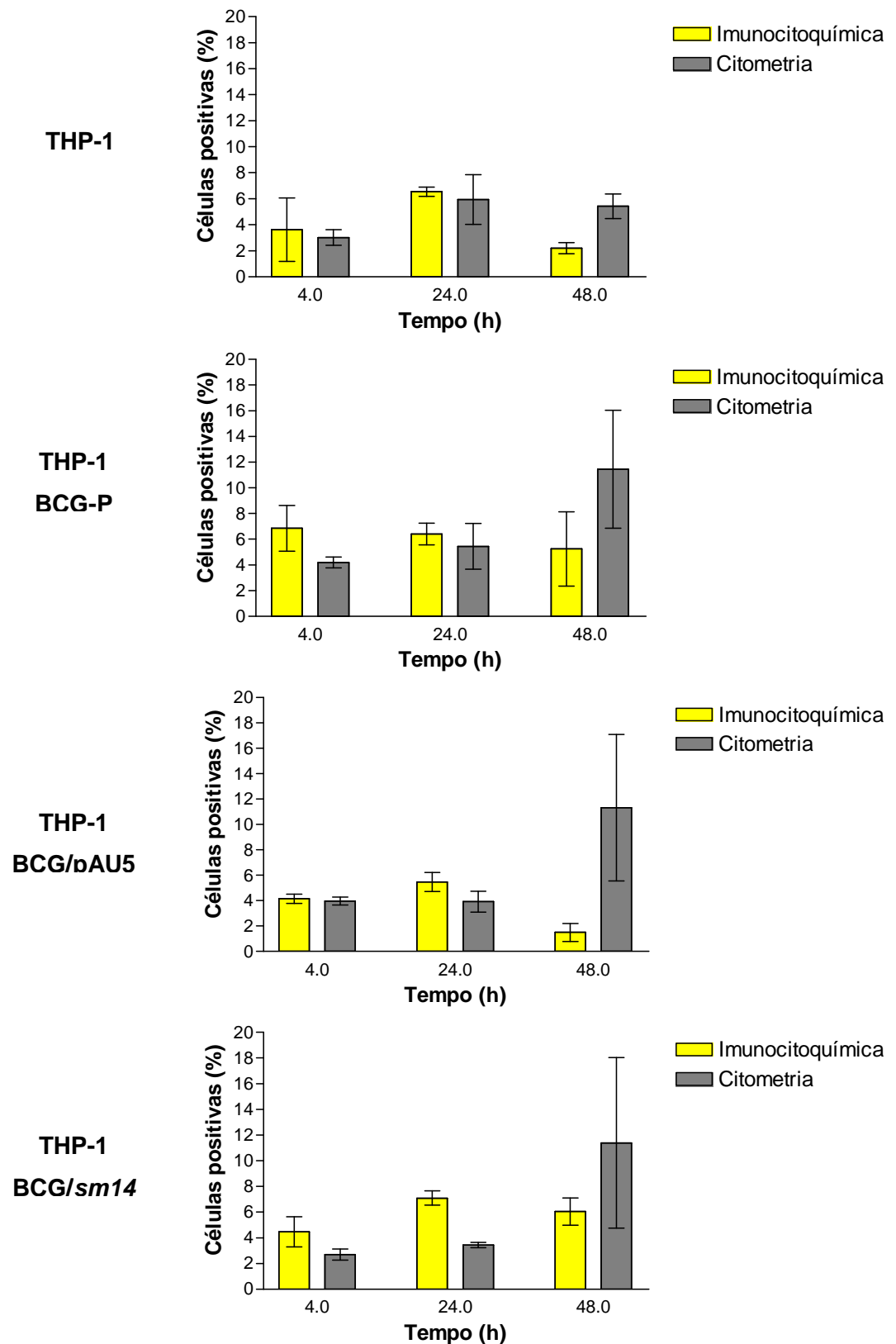


Figura 4.16: Percentagem de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

Os resultados obtidos por ambas as técnicas, apesar de divergentes entre si, não permitiram identificar diferenças no perfil de citocinas fabricadas pelas células THP-1 infectadas pelo BCG/*sm14* e pelos BCGs controles.

5. DISCUSSÃO

Devemos considerar alguns pontos importantes para se estudar a resposta imune desencadeada por protótipos vacinais, bem como sua eficácia. Dentre eles, podemos indicar a impossibilidade de se realizar experimentos em seres humanos sem prévios estudos *in vitro* em células humanas e/ou de animais e *in vivo* em animais de experimentação, apesar de sabermos que estes não reproduzem fielmente toda a gama de indução da resposta imune observado no homem (Metz *et al* 2002). Outras questões sobre o uso de animais em experimentação envolvem o benefício potencial contraposto ao sofrimento animal, aspectos legais, morais e éticos. Por estas razões um grande esforço vem sendo realizado na busca de métodos alternativos que sejam capazes de substituir, diminuir ou refinar os métodos de utilização de animais em experimentação, conforme descrito na teoria dos “3 Rs” – *Replacement* (substituição), *Refinement* (refinamento) e *Reduction* (redução) - descrita por Russell e Burch em 1959 (Dellepiane, Griffiths & Milstien 2000, Metz *et al.* 2002, Presgrave 2003).

A grande pressão internacional sobre as indústrias de fármacos, cosméticos e imunobiológicos que são grandes usuárias de animais no desenvolvimento, produção e testes de eficácia e segurança de produtos no sentido de buscarem a validação e aplicação de novas técnicas baseadas nos 3Rs, levou a criação de órgãos como o *Fund for Replacement of Animal Medical Experiments* (FRAME) que, desde 1983, edita uma revista internacional intitulada *Alternatives to Laboratory Animals* (ATLA). Em 1994, foi inaugurado o Centro Europeu para a validação de métodos alternativos (*European Centre for the Validation of Alternative Methods* - ECVAM). Outras instituições, como *Cosmetic, Toiletries and Frangrance Association* (CTFA), *Interagency Regulatory Alternatives Group* (IRAG), *Food and Drug Administration* - EUA (FDA) também atuam nos estudos de relevância e confiabilidade de propostas alternativas, pela pesquisa dos métodos atualmente utilizados e o desenvolvimento e validação de novos testes, para que os produtos químicos e os produtos de várias espécies possam ser manufaturados de forma mais segura e econômica, visando reduzir o uso e minimizar o sofrimento dos animais (Balls 2002, Hendriksen 2005).

Um dos métodos alternativos para substituição ou pelo menos diminuição do uso de animais nas fases de desenvolvimento, produção e testes de algumas vacinas é a adoção de sistemas de ensaios *in vitro*, dentre os quais podemos

destacar o uso de cultura de células (Metz *et al* 2002, Presgrave 2002, Presgrave 2003). A principal vantagem da utilização *in vitro* de cultivos celulares é o controle do ambiente de cultura, podendo-se controlar condições físico-químicas (pH, temperatura, pressão osmótica, níveis de oxigênio (O₂) e CO₂, tensão superficial) e fisiológicas (hormônios, fatores de crescimento, densidade celular), que podem ser mantidas relativamente constantes (Doyle & Griffiths 1998, Freshney 2000a). Outras vantagens relevantes são: a homogeneidade das células em cultivo em relação à morfologia e especificidades uniformes, podendo com facilidade obter um número elevado de réplicas idênticas, superando assim o problema de heterogeneidade de amostras, reduzindo a variação e o custo dos experimentos, possibilitando a realização de múltiplos testes com muitas variáveis (Doyle & Griffiths 1998, Freshney 2000a).

A técnica de cultura de células integrada com sistemas computacionais e a hierarquização de métodos podem ser ferramentas importantes para etapas do desenvolvimento de protótipos vacinais (Figura 5.1), sendo utilizada principalmente para procedimentos de seleção (*screening*) de vacinas candidatas na fase pré-clínica (Henriques & Sampaio 2002, Larsen 2005).

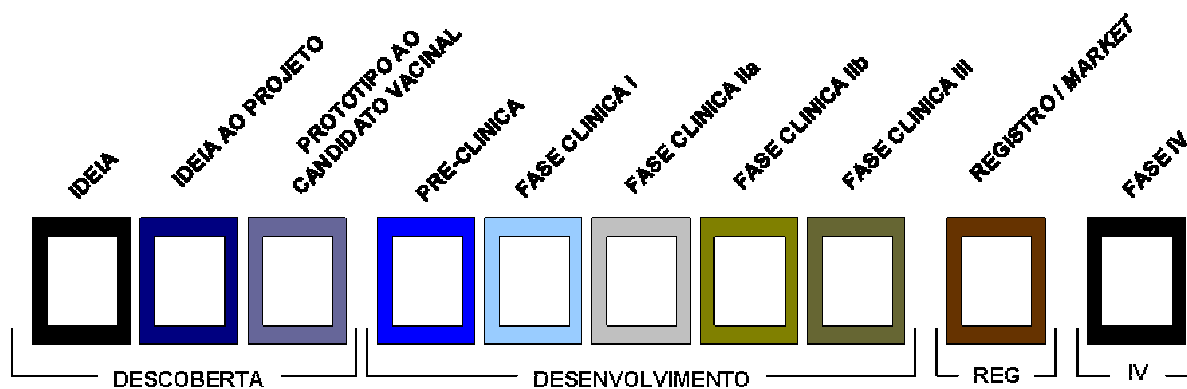


Figura 5.1: Modelo esquemático das etapas necessárias para implantação de novos fármacos e imunobiológicos (Adaptado de Larsen 2005).

Este estudo visou o desenvolvimento de um protocolo para a seleção de protótipos vacinais utilizando como modelo *M. bovis* BCG sub-cepa Pasteur expressando o antígeno Sm14 de *Schistosoma mansoni* e a linhagem de monócitos humanos THP-1 como substrato celular. Contudo, a eficiência da resposta imune induzida por BCGs recombinantes é dependente da capacidade de expressão da proteína heteróloga, uma vez que essa expressão pode interferir na

ativação celular. Assim, confirmamos a expressão da proteína Sm14 por todos os clones do protótipo vacinal BCG/*sm14*, e nossos resultados corroboram com relatos anteriores Argondizzo (2005), utilizando o mesmo sistema de expressão. Desta forma, assumimos que todos os recombinantes BCG/*sm14* estavam expressando a proteína de interesse em quantidade suficiente para o prosseguimento dos experimentos de infecção com os protótipos vacinais em linhagens monocíticas.

Para a realização dos ensaios de infecção de células THP-1 com o BCG/*sm14*, foi necessário determinar a MOI capaz de induzir a melhor dose resposta para a expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α . Assim sendo, foram avaliadas três diferentes relações, 5, 10 e 50 BCGs para cada célula THP-1. Os resultados obtidos mostram que o fato da MOI de 50 BCG:THP-1 não ter estimulado adequadamente a expressão de citocinas, sugere que esta concentração de BCG promove perda da viabilidade de células THP-1 (Hassan *et al* 2006). Por outro lado, a MOI de 10 de BCG/THP-1 estimula uma maior porcentagem de células produtoras de IL-10 e IL-12, tendo sido considerada, portanto a melhor dose-resposta para a síntese das citocinas neste estudo. Entretanto, ao contrário do observado por Oliveira, Charlab & Pessolani (2001), que na análise das MOI de 1, 10 e 100 de BCG e *M. leprae* para cada célula THP-1, concluíram que a relação de 10:1 de micobactérias-célula THP-1 induz uma maior produção de TNF- α , no presente trabalho a MOI de 5 BCGs apresentou o melhor resultado com relação às células produtoras de TNF- α . Atkinson e colaboradores (2000), realizaram de forma semelhante uma pesquisa do perfil de citocinas (IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α) expressas por linhagem primária de macrófagos humanos infectadas com MOI de 0,2, 1 e 5 BCGs, concluindo que a MOI de 5 BCG/célula induz de forma eficiente a expressão das citocinas IL-10 e TNF- α por macrófagos infectados. Devido a divergências entre os resultados obtidos neste trabalho e os resultados relatados na literatura para determinar a relação padrão para avaliação de citocinas a partir da interação BCG-macrófago, e como o maior percentual de células expressando IL-10 e IL-12 foi atingido com a relação de 10 BCG para cada célula THP-1, optamos por usar esta proporção nos ensaios de imunocitoquímica e citometria para a quantificação das células produtoras de citocinas infectadas com o protótipo vacinal BCG/*sm14*.

Dentre os requerimentos para se determinar o sucesso de protótipos vacinais está a indução e ativação das APCs, que irão realizar o processamento de antígenos, a expressão de fatores co-estimulatórios, secreção de citocinas e a

apresentação antigênica às células T, tornando-se essenciais para o desencadeamento da resposta imune (Ada 2004). Neste contexto, utilizamos uma linhagem de monócitos humanos como modelo para infecção, recuperação e análise do perfil de citocinas (IL-10, IL-12 e TNF- α) expressas em células THP-1 após infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14*. Vários autores têm utilizado esta linhagem celular como modelo de averiguação do perfil de ativação celular em monócitos (Diaz-Silvestre *et al.* 2005, Xia *et al.* 2005, Ciabattini *et al.* 2006) ou células maduras – macrófagos (Oliveira, Charlab & Pessolani 2001, Lewis *et al.* 2003, Theus, Cave & Eisenach 2004, Theus, Cave & Eisenach 2005, Hasan *et al.* 2006).

Da mesma forma, autores como Takahashi (2003), Ada (2004) e Plotkin (2005a), destacam que o reconhecimento e a ativação das APCs podem ser considerados como etapas relevantes para avaliação de protótipos vacinais e para o sucesso vacinal. Os monócitos são importantes células efetoras capazes de responder rapidamente a estímulos imunes de diferentes formas, como produção de proteínas inflamatórias, expressão de moléculas de adesão em sua superfície, ativação e diferenciação em macrófagos. Neste contexto, utilizamos a cintilografia para o acompanhamento da proliferação da célula THP-1 infectada ou não com o protótipo vacinal BCG/*sm14*, com a amostra vacinal de BCG Pasteur e com a construção BCG/pAU5. A medição de partículas beta emitidas pela timidina-H³ captada pelas células THP-1, nos permite determinar a capacidade do protótipo vacinal de ativar as células THP-1 e modificar seu estado de célula jovem, indiferenciada (monócitos) e transformá-las em células ativadas (macrófagos), a partir da redução de sua capacidade de replicação (Bennett *et al.* 1993). Nas condições avaliadas, nossos resultados mostram que as amostras de BCGs utilizadas para infectar as células THP-1 foram capazes de estimular esta linhagem, não sendo evidenciada diferenças no perfil de ativação induzido pela amostra vacinal de BCG, o protótipo vacinal BCG/*sm14* e a construção BCG/pAU5. Como a ativação dos monócitos/macrófagos não é específica, não podemos determinar o “quanto” a proteína Sm14 foi responsável pela diferenciação celular. Experimentos futuros devem ser desenhados para determinar neste sistema a capacidade de ativação da proteína Sm14.

Além da avaliação da proliferação de células THP-1, autores como Medeiros (2001), Varaldo e colaboradores (2004) e Argondizzo (2005), assinalaram a necessidade de avaliarmos a capacidade de infecção e a manutenção do

crescimento intracelular de protótipos vacinais baseados na tecnologia do BCG recombinante em culturas de monócito/macrófago. Com esse objetivo, montamos um experimento para acompanhar a cinética de crescimento do BCG/*sm14*, em paralelo com os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5) empregados na infecção e na recuperação em células THP-1, nos tempos de 4, 24 e 48 horas. Nossos dados assemelham-se com os descritos na literatura (Medeiros 2001, Varaldo *et al.* 2004, Argondizzo 2005), não detectando diferenças significativas na capacidade de infecção e de crescimento intracelular entre as amostras de BCG testadas, sendo visualizada uma pequena redução do número de UFC recuperadas entre o período basal de 4 horas e após 24 e 48 horas. Podemos concluir que nas condições estudadas o protótipo vacinal BCG/*sm14* possui a mesma aptidão de infecção e persistência intracelular da amostra vacinal BCG Pasteur e da construção BCG/pAU5, favorecendo seu uso como protótipo vacinal.

Devido à problemática da estabilidade de plasmídeos recombinantes, a qual interfere fundamentalmente com a expressão da proteína heteróloga por vacinas recombinantes baseadas em vetores vivos atenuados e, evidentemente, na plataforma do BCG recombinante (Haeseleer 1994), realizou-se a avaliação da estabilidade funcional do BCG transformado com o plasmídeo pAU5-*sm14* (BCG/*sm14*). A capacidade dos BCGs recombinantes (BCG/*sm14* e BCG/pAU5) de manterem o fenótipo de resistência para canamicina (Kan), mostra que não há diferença expressiva entre os BCGs recombinantes cultivados nos meios seletivo (7H11+Kan) e não seletivo (7H11). Esses resultados confirmam os dados obtidos no trabalho realizado por Argondizzo (2005) e são extremamente importantes para o desenvolvimento de vacinas baseada na utilização do BCG como vetor vivo atenuado de imunógenos, porque demonstram que BCGs recombinantes permanecem estáveis e expressando continuamente o gene inserido mesmo no ambiente intracelular de macrófagos (Medeiros 2001, Argondizzo 2005).

Recentemente Chabalgoity e colaboradores (2007) descrevem a importância da indução de citocinas para o desenvolvimento de uma resposta protetora para o desenho de vacinas. Visando obter dados preliminares que permitam demonstrar a viabilidade da seleção *in vitro* de vacinas, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar a possibilidade de se determinar o perfil de citocinas induzidas por protótipos vacinais em linhagem de células humanas.

As citocinas são consistentemente avaliadas e quantificadas durante testes pré-clínicos e clínicos, como marcadores de ativação e/ou supressão da resposta

imune induzida pelos protótipos vacinais. Nessa conjuntura, foi realizada a análise das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α expressas pela infecção com protótipo vacinal BCG/*sm14*, com a amostra vacinal de BCG Pasteur e com a construção BCG/pAU5 em células THP-1. Para a detecção intracelular de citocinas em células, utilizamos a técnica de imunocitoquímica (Santiago 2003) e a técnica de citometria (Kallás 1999).

A produção de citocinas induzidas pelo BCG em células mononucleares periféricas humanas segue uma cinética (Sander *et al.* 1995) que varia de indivíduo para indivíduo e tende a ser mediada por um perfil Th1 nos primeiros 5 a 7 dias, regredindo e assumindo perfil Th2 posteriormente (9 a 12 dias após a infecção). Contudo, estes autores não diferenciaram a produção de IL-10 pelos monócitos/macrófagos e linfócitos T. Mas a detecção de IL-10 foi identificada somente após 10 dias de infecção, o que contradiz nossos resultados e os de Atkinson e colaboradores (2000). Uma possível explicação pode estar na metodologia utilizada, na utilização de células não estimuladas e na obtenção destas células de indivíduos não expostos a micobactérias ou não vacinados pelo BCG. Sander e colaboradores (1995) utilizaram a técnica de imunofluorescência indireta e observação microscópica, enquanto Atkinson e colaboradores (2000) utilizaram macrófagos derivados de monócitos humanos. Em nosso sistema, a secreção de IL-10 é evidenciada em células THP-1 sem prévia ativação após 4 horas de incubação, da mesma forma após 24 horas observamos resultados similares aos descritos por Atkinson e colaboradores (2000) em macrófagos derivados de monócitos (*Monocyte-derived macrophage* – MDM). De modo interessante estes autores evidenciaram uma grande variabilidade na secreção de citocinas por MDM humanos, neste caso variando de 1,0 a 7,0% de células positivas para IL-10 após 20 horas de infecção. Observamos uma diferença entre nossos resultados obtidos pelas duas técnicas (imunocitoquímica e citometria), variando de 6,4% a 11,4%, respectivamente.

Quanto a secreção de IL-12 evidenciamos que as células THP-1 produzem, mesmo sem estímulos valores entre 2,7% e 8,8%, contudo Ciabattini e colaboradores (2006) descrevem a expressão de níveis basais de IL-12 em células mononucleares humanas (Ciabattini *et al.* 2006; 1 a 3%). O perfil de expressão de IL-12 expresso pelas células THP-1 não pode ser claramente identificado pela discrepância entre as duas metodologias utilizadas por nós, ou seja, a técnica de imunocitoquímica mostrou que 8,8% das células expressavam IL-12, enquanto que por citometria identificamos 2,7% de células positivas. Contudo após infecção pelo BCG foi observado um percentual que variou de 4,6% a 6,5% após 24 horas e 6,1 a

12,0% após 48 horas, indicando um aumento progressivo de células produtoras de IL-12. A infecção pelo BCG/sm14 também foi capaz de induzir percentuais semelhantes de células produtoras de IL-12.

Independente da metodologia utilizada, as infecções por BCG e BCG/sm14 induziram um percentual ligeiramente maior de células expressando IL-10 do que IL-12. Este perfil parece ser característico das células THP-1, e a infecção com BCG/sm14 não foi capaz de modificar esse perfil.

Uma análise mais longa, estudando a associação entre o BCG e as células THP-1 pode responder se a indução tardia destas citocinas pode ser modificada, visto não termos evidenciado esta mudança em culturas de até dois dias de interação.

Uma das maiores dificuldades para o desenvolvimento de uma vacina contra esquistossomose está a complexidade da interação entre patógeno e hospedeiro. As cercárias, os vermes adultos e os diferentes estágios de desenvolvimento entre estas formas apresentam mecanismos que permitem a estes evadir de uma resposta imune efetiva, incluindo a produção de moléculas antiinflamatórias, a inibição da migração de células apresentadoras de antígeno e a cobertura da superfície do parasito com moléculas do hospedeiro (Lebens *et al.* 2004). Outro ponto importante é o pouco entendimento da natureza da resposta imune protetora (Wynn & Hoffmann 2000, Pearce & McDonald 2002, Lebens *et al.* 2004).

Alguns autores demonstraram que em modelo murino e humano, a resposta Th2 seria eficaz para o controle da doença, ao passo que estudos de vacinação em camundongos indicam que uma imunidade mediada por células T, envolvendo a produção de IFN- γ e IL-12 (Th1), poderia ser melhor (Capron *et al.* 1995, Wynn & Hoffmann 2000). No entanto, a questão da resposta imune efetiva contra esquistossomose ainda é bastante polêmica. Existem autores que acreditam ser a resposta imune humoral a mais eficaz para a proteção de humanos e outros defendem a resposta imune celular, mas existem, também, aqueles que acreditam que ambas as respostas humoral e celular são imprescindíveis para a proteção (Brito *et al.* 2000, Ribeiro de Jesus *et al.* 2000, Varaldo *et al.* 2004). Estudos imunológicos em pessoas residentes em zonas endêmicas para esquistossomose, demonstraram altos níveis de IgE e IFN- γ , sugerindo a participação das respostas celular e humoral nos mecanismos imunológicos de resistência natural a reinfecção de *S. mansoni* (Ribeiro de Jesus *et al.* 2000). O estudo realizado por Brito e colaboradores (2000) na avaliação das respostas imunes frente à proteína Sm14 em

grupos de pessoas residentes em zonas endêmicas de esquistossomose e de pacientes crônicos e tratados para a doença, em relação à avaliação das citocinas produzidas, os níveis de IL-5 e IL-10, conhecidas como citocinas Th2, não foram estatisticamente diferentes em nenhum dos grupos estudados. Já o IFN- γ e TNF- α foram produzidos em quantidades significativamente maiores pelas PBMC de indivíduos normais endêmicos. Adicionalmente demonstraram que a IL-10 é uma importante citocina moduladora de respostas de células T na esquistossomose crônica, enquanto que a proliferação de linfócitos no grupo resistente não infectado é dependente de IFN- γ . Estes resultados sugerem que a resposta imune do tipo Th1 induzida em indivíduos normais endêmicos para um antígeno de esquistossomo poderia estar associada com resistência à infecção e também destacou a importância da Sm14 como potencial candidato vacinal contra esquistossomose humana (Brito *et al.* 2000).

Uma possível justificativa para nossos resultados seria o fato da proteína Sm14 ser expressa no citoplasma do BCG aliado a persistência intracelular BCG/*sm14* em células THP-1, não estando assim, disponível para a estimulação dos macrófagos. Nesse caso a apresentação do antígeno de interesse (Sm14) só acontece quando a Sm14 é liberada do fagossomo após a destruição do BCG (Kaufmann & Hess 1999). Dados obtidos por Varaldo e colaboradores (2004) e Argondizzo (2005), demonstram que não foram detectados anticorpos anti-Sm14 em camundongos imunizados com cepas recombinantes de BCG/*sm14*. Todavia vários autores já demonstraram, não somente a expressão de diversos antígenos no citoplasma de BCG recombinantes, como também conseguiram induzir uma eficiente resposta imune humoral, independente do sistema de apresentação no qual o antígeno alvo estava sendo expresso (Aldovini & Young 1991, Murray *et al.* 1992, Stover *et al.* 1991, Kremer *et al.* 1998, Hayward *et al.* 1999; da Cruz *et al.* 2002).

Os resultados obtidos não foram capazes de diferenciar o protótipo vacinal BCG/*sm14*, da amostra vacinal BCG Pasteur e da construção BCG/pAU5, não servindo, portanto, como comparativo aos trabalhos descritos para a determinação do perfil de citocinas obtidas nas respostas imunes contra o BCG e contra a proteína Sm14.

6. CONCLUSÕES

- Desenvolveu-se um protocolo de infecção com BCGs em células THP-1, determinando que a melhor relação foi de 10 BCGs para cada célula THP-1.
- A expressão da proteína recombinante Sm14 sintetizada pelos clones de BCG/*sm14* demonstrou-se satisfatória para realização dos experimentos de infecção em células THP-1
- O protótipo vacinal BCG/*sm14* manteve o mesmo grau de infecciosidade e persistência intracelular da sub-cepa vacinal BCG Pasteur.
- O protótipo vacinal BCG/*sm14* manteve a mesma capacidade de induzir a diferenciação e a maturação de macrófagos provenientes da linhagem de monócitos THP-1 que a sub-cepa vacinal BCG Pasteur.
- O protótipo vacinal BCG/*sm14* não foi capaz de modificar o perfil de IL-10, IL-12 e TNF- α induzido pela sub-cepa vacinal BCG Pasteur em células THP-1

7. PERSPECTIVAS

- Como a indução da resposta imune ao *Schistosoma mansoni* é preferencialmente induzida por resposta Th2 (aumento de IL-10 e diminuição de IL-12, IFN- γ e IL-2), a utilização do recombinante BCG/*sm14* como protótipo vacinal pode ser de relevância para a indução de resposta protetora para a esquistossomose, como para a tuberculose, visto que não houve diferença marcante na produção de IL-10 e/ou IL-12.
- Novos experimentos devem ser realizados para determinar o papel das células apresentadoras de antígenos na modulação de células T CD4 e CD8 visando um melhor entendimento da resposta imune adaptativa e de memória.
- A modulação das células apresentadoras de antígenos (monócitos, macrófagos, células dendríticas) pode direcionar a resposta imune a protótipos vacinais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK & Lichtman AH. **Imunologia celular e molecular**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005a. Cap.11: Citocinas. p. 251–282.

_____. **Imunologia celular e molecular**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005b. Cap.12: Imunidade inata. p. 283–306.

Ada G. The immunology of vaccination. In: Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines**. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2004. p. 31–46

_____. **Vaccines and vaccination**. N Engl J Med. 2001; 345 (14): 1042–1053

Al-Sherbiny M, Osman A, Barakat R, El Morshedy H, Bergquist R, Olds R. **In vitro cellular and humoral responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens**. Acta Trop. 2003; 88 (2): 117-130.

Aldovini A & Young RA. **Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-mv vaccines**. Nature. 1991; 351: 479–482

Amadori M, Ritelli M, Tagliabue S, Pacciarini ML. **Macrophage cell cultures for rapid isolation of intracellular bacteria: the *Mycobacterium bovis* model**. Methods Mol Biol. 2006; 345: 203–217

André FE. **Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises**. Vaccine 2003; 21: 593–595.

Argondizzo APC. **Construção do *M. bovis* BGC recombinante Sm14r e Avaliação da sua Capacidade Protetora contra Esquistossomose no Modelo Murino**. Rio de Janeiro; 2005. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] – FIOCRUZ

ATCC – *American type culture collection* **THP-1 Catalog Details: TIB-202** [online]. Manassas, EUA. 2006. [capturado em 10 de setembro de 2006]. Disponível em: <http://www.atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=TIB-202>

Atkinson S, Valadas E, Smith SM, Lukey PT, Dockrell HM. **Monocyte-derived macrophage cytokine responses induced by *M. bovis* BCG**. Tuber Lung Dis. 2000; 80 (4-5):197-207. Erratum in: Tuber Lung Dis 2000; 80 (6): 293.

Auwerx J. **The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation**. Experimentia. 1991; 47: 22–31.

Balls M. **Future Improvements: replacement *in vitro* methods**. ILAR J. 2002; 43 (Suppl): S69–S73

Bastos K.RB, Alvarez JM, Marinho CRF, Rizzo LV, D'Império Lima MR. **Macrophages from IL-12p40-deficient mice have a bias toward the M2 activation profile**. J. Leukoc. Biol. 2002; 71: 271–278

Bennett S, Por SB, Cooley MA, Breit SN. ***In vitro* replication dynamics of human culture-derived macrophages in a long term serum-free system**. J Immunol. 1993; 150 (6): 2364–2371

Berges C, Naujokat C, Tinapp S, Wieczorek H, Hoh A, Sadeghi M, Opelz G, Daniel V. **A cell line model for the differentiation of human dendritic cells.** Biochem Biophys Res Commun. 2005; 333 (3): 896–907

Beverley PCL. **Immunology of vaccination.** Br Med Bull. 2002; 62: 15-28

Bonah C. **The 'experimental stable' of the BCG vaccine: safety, efficacy, proof, and standards, 1921-1933.** Stud Hist Philos Biol Biomed Sci. 2005; 36(4): 696–721

Brito CF, Caldas IR, Coura Filho P, Correa-Oliveira R, Oliveira SC. **CD4+ T cells of schistosomiasis naturally resistant individuals living in an endemic area produce interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha in response to the recombinant 14KDA *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein.** Scand J Immunol. 2000; 51 (6): 595–601

Brusic V, August JT & Petrovsky N. **Information technologies for vaccine research.** Expert Rev Vaccines. 2005; 4 (3): 407–417

Campbell D, Mann BJ & Chadee K. **A subunit vaccine candidate region of the *Entamoeba histolytica* galactose-adherence lectin promotes interleukin-12 gene transcription and protein production in human macrophages.** Eur J Immunol. 2000; 30 (2): 423-30.

Capron A, Riveau G, Grzych JM, Boulanger D, Capron M, Pierce R. **Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomes: background and update.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 1995; 90 (2): 235–240

Carrel A. **On the permanent life of tissues outside the organism.** J. Exp. Med. 1912, 15: 516 – 528 *apud* Freshney RI. Introduction to basic principles. In: Masters JRW. **Animal cell culture: a practical approach.** 3rd ed. Oxford: Oxford University Press. 2000b: 1-18.

Chabalgoity JA, Baz A, Rial A, Grille S. **The relevance of cytokines for development of protective immunity and rational design of vaccines.** Cytokine Growth Factor Rev. 2007; 18 (1-2): 195–207

Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. **The global status of schistosomiasis and its control.** Acta Trop. 2000; 77 (1): 41–51

Ciabattini A, Cuppone AM, Pulimeno R, Iannelli F, Pozzi G, Medaglini D. **Stimulation of human monocytes with the gram-positive vaccine vector *Streptococcus gordonii*.** Clin Vaccine Immunol. 2006; 13 (9): 1037-43.

Clingan JM, Yanagawa Y, Iwabuchi K, Onoé K. **Effect of T helper 1 (Th1) / Th2 cytokine on chemokine-induced dendritic cell functions.** Cell Immunol. 2006; 242: 72–79.

Costa-Carvalho BT & Sole D. Bases Imunológicas. In: Farhat CK, Carvalho ES, Weckx LY, Carvalho LHFR, Succi RCM, org. **Imunizações: fundamentos e prática** 4^a ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2000. p. 19–36.

da Cruz FW, McBride AJA, Conceição FR, Dale JW, McFadden J, Dellagostin OA. **Expression of the B-cell and T-cell epitopes of the rabies virus nucleoprotein in *Mycobacterium bovis* BCG and induction of an humoral response in mice.** *Vaccine*. 2002; 20: 731–736

Dai W, Gao H, Huang H, Yuan Y, Hu J, Huangfu Y. **Comparative study on the immunogenicity between recombinant MS-Sj26GST vaccine and recombinant BCG-Sj26GST vaccine in *Schistosoma japonicum*.** *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2003, 23 (3): 213–5

Dellepiane N, Griffiths E & Milstien JB. **New challenges in assuring vaccine quality.** *Bull World Health Organ*. 2000; 78 (2): 155–62

Di Marzo P, Puddu P, Conti L, Belardelli F, Gesani S. **Interferon- γ up-regulates its own gene expression in mouse peritoneal macrophages.** *J Exp Med*. 1994; 179: 1731-1736.

Diaz-Silvestre H, Espinosa-Cueto P, Sanchez-Gonzalez A, Esparza-Ceron MA, Pereira-Suarez AL, Bernal-Fernandez G, Espitia C, Mancilla R. **The 19-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a major adhesin that binds the mannose receptor of THP-1 monocytic cells and promotes phagocytosis of mycobacteria.** *Microb Pathog*. 2005; 39 (3): 97–107

Doyle A & Griffiths JB. **Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology.** West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 1998. Cap.1 The cell: Selection and standardization. p. 3–52

Ellis RW. Technologies for making new vaccines. **In:** Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines**. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2004. p. 1177–1198

Esser MT, Marchese RD, Kierstead LS, Tussey LG, Wang F, Chirmule N, Washabaugh MW. **Memory T cells and vaccines.** *Vaccine*. 2003, 21 (5-6): 419–430

Fantuzzi L, Puddu P, Varano B, Del Corno M, Belardelli F, Gessani S. **IFN-alpha and IL-18 exert opposite regulatory effects on the IL-12 receptor expression and IL-12-induced IFN-gamma production in mouse macrophages: novel pathways in the regulation of the inflammatory response of macrophages.** *J Leukoc Biol*. 2000; 68: 707-714.

FDA – *Food and drug administration*.. **Guidance for industry: Characterization and qualification of cell substrates and other biological starting materials used in the production of viral vaccines for the prevention and treatment of infectious disease.** [online]. Rockville: 2006. [capturado em 10 de janeiro de 2007]. Disponível em: <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>.

Fernandes ATG. **Identificação de células citotóxicas presentes no processo inflamatório uterino durante a co-infecção pelo vírus da imunodeficiência humana HIV e pelo vírus do papiloma humano HPV.** Rio de Janeiro. 2003. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] Fiocruz.

Freshney RI. Introduction to basic principles. In: Masters JRW, org. **Animal cell culture: a practical approach**. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press. 2000a. p. 1–18

_____. **Culture of animal cells: a manual of basic techniques**. 4th ed. New York: Wiley-Liss Inc. 2000b. Cap.1: Introduction. p. 1–8

Guermontez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. **Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells**. Annu Rev Immunol. 2002; 20: 621-67.

Haeseleer F. **Structural instability of recombinant plasmids in mycobacteria**. Res Microbiol. 1994; 145: 683–687

Harrison RG. **Observations on the living developing nerve fiber**. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1910, 140: 1905 – 7 *apud* Freshney RI. Introduction to basic principles. In: Masters JRW, org. **Animal cell culture: a practical approach**. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press. 2000b. p. 1-18.

Hasan Z, Ashraf M, Tayyebi A, Hussain R. **M. leprae inhibits apoptosis in THP-1 cells by downregulation of Bad and Bak and upregulation of Mcl-1 gene expression**. BMC Microbiol. 2006; 6: 1-9.

Hayward CMM, O'Gaora P, Young DB, Griffin GE, Thole J, Hirst TR, Castello-Branco LR, Lewis DJM. **Construction and murine immunogenicity of recombinant Bacille Calmette Guérin vaccines expressing the B subunit of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin**. Vaccine. 1999, 17: 1272–1281.

Hendriksen CFM. **Laboratory animals and immunization procedures: challenges and opportunities**. ILIAR J. 2005; 46 (3): 227–229.

Henriques MGMO & Sampaio ALF. Alternativas para animais de laboratório: sistemas *in vitro*. In: Andrade A, Pinto SC & Oliveira RS, org. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002: 337–344

Kallás EG. **Detecção da produção antígeno-específica de IFN γ e IL-4 por linfócitos T de sangue periférico após infecção e vacinação**. São Paulo 1999. Doutorado [Escola Paulista de Medicina] Universidade Federal de São Paulo

Kaufmann SHE & Flynn JL. CD8 T cells in tuberculosis. In: Cole ST, Eisenach D, McMurray DN, Jacobs Jr WR, org. **Tuberculosis and the tubercle bacillus**. Washington: ASM Press. 2005. p. 155–164.

Kaufmann SH & Hess J. **Impact of intracellular location of and antigen display by intracellular bacteria: implications for vaccine development**. Immunol Lett. 1999; 65 (1-2): 81–4

Kidd P. **Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease**. Altern Med Rev. 2003; 8 (3): 223-246.

Kremer L, Dupre L, Riveau G, Capron A, Loch C. **Systemic and mucosal immune responses after intranasal administration of recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin expressing glutathione S-transferase from *Schistosoma haematobium*.** Infect Immun. 1998; 66 (12): 5669-5676.

Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, Graeber TG, Sieling PA, Liu YJ, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. **TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells.** Nat Med. 2005, 11 (6): 653–660

Laemmli UK. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature. 1970, 227: 680-685

Larsen NG. **Drug and Device Development Guide.** Copenhagen: Medicon Valley Academy. 2005. Cap. 1: Development – definition, costs and time. p. 9-13

Lebens M, Su J, Czerkinsky C, Holmgren J. **Current status and future prospects for a vaccine against schistosomiasis.** Expert Rev Vaccines. 2004; 3 (3): 315-328.

Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, Sherman DR. **Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation.** J Infect Dis. 2003; 187 (1): 117–123

MacCullough KC & Summerfield A. **Basic concepts of immune response and defense development.** ILAR J. 2005; 46 (3): 230–240.

Mantovani A, Sica A & Locati M. **Macrophage polarization comes of age.** Immunity. 2005; 23 (4): 344 – 346

MacFarland J. **Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines.** J Am Med Assoc. 1907; 14: 1176-1178

Medeiros MA. **Desenvolvimento do *Mycobacterium bovis* BCG como sistema de expressão de antígeno vacinal de *Bordetella pertussis*.** Pelotas; 2001. Doutorado – Universidade Federal de Pelotas.

Medeiros MA, Armoa GR, Dellagostin AO, McIntosh D. **Induction of humoral immunity in response to immunization with recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the S1 subunit of *Bordetella pertussis* toxin.** Can. J. Microbiol. 2005; 51 (12): 1015 - 20.

Metz B, Hendriksen CFM, Jiskoot W, Kersten GFA. **Reduction of animal use in vaccine quality control: opportunities and problems.** Vaccine. 2002, 20: 2411 – 2430

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Annette MH. **M1/M2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm.** J Immunol. 2000; 164: 6166-6173.

Misumi S, Endo M, Mukai R, Tachibana K, Umeda M, Honda T, Takamune N, Shoji S. **A novel cyclic peptide immunization strategy for preventing HIV-1/AIDS infection and progression.** J Biol Chem. 2003; 278 (34): 32335-43.

- Mosmann TR. **Cytokines: is there biological meaning?** Curr. Opin Immunol. 1991, 3: 311-314
- Mosmann TR & Coffman RL. **Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells.** Adv. Immunol. 1989, 46: 111-147
- Murray A, Winter N, Lagranderie M, Hill DF, Rauzier J, Timm J, Leclerc C, Moriaty KM, Gheorghiu M, Gicquel B. **Expression of *Escherichia coli* beta-galactosidase in *Mycobacterium bovis* BCG using an expression system isolated from *Mycobacterium paratuberculosis* which induced humoral and cellular immune responses.** Mol Microbiol. 1992, 6 (22): 3331-3342.
- NIAID - *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*. **Understand vaccines: What they are / How they work.** Washington: NIH publication, 2003. 55 pp.
- Ohara N & Yamada T. **Recombinant BCG vaccines.** Vaccine. 2001, 19: 4089–4098
- Oliveira MM, Charlab R, Pessolani MC. ***Mycobacterium bovis* BCG but not *Mycobacterium leprae* induces TNF-alpha secretion in human monocytic THP-1 cells.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96 (7): 973-978.
- Parlow TG. A resposta imunológica. In: Parlow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB, org. **Imunologia médica.** 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004. p. 52-60.
- Pearce EJ & McDonald AS. **The immunobiology of schistosomiasis.** Nat Rev Immunol. 2002; 2 (7):499-511.
- Plotkin SA. **Six revolutions in vaccinology.** Pediatr Infect Dis J. 2005a, 24 (1): 1–9
- _____. **Vaccines: past, present and future.** Nat Med. 2005b, 11 (4 Suppl): S5-S11.
- Plotkin SL & Plotkin SA. A short history of vaccination. In: Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines.** 4th ed. Philadelphia: Saunders, 2004: 1-12
- Presgrave OAF. **Teste de liberação de citocinas como método alternativo ao ensaio de pirogênio em coelhos no controle da qualidade de produtos injetáveis.** Rio de Janeiro; 2003. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] - Fundação Oswaldo Cruz
- Presgrave OAF. Alternativas para animais de laboratório: do animal ao computador. In: Andrade A, Pinto SC & Oliveira RS, org. **Animais de laboratório: criação e experimentação.** Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002. p. 361–368
- Rappuoli R. **From Pasteur to genomics: progress and challenges in infectious diseases.** Nat Med. 2004, 10 (11): 1177–1185
- Reis e Sousa C. **Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity.** Curr Opin Immunol. 2004a, 16 (1): 21–5

- _____. **Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls.** *Semin Immunol.* 2004b, 16 (1): 27–34
- Rezende CA, De Moraes MT, de Souza Matos DC, McIntoch D, Armoa GR. **Humoral response and genetic stability of recombinant BCG expressing hepatitis B surface antigens.** *J Virol Methods* 2005; 125 (1): 1–9.
- Ribeiro de Jesus A, Araújo I, Bacellar O, Magalhães A, Pearce E, Harn D, Strand M, Carvalho EM. **Human immune responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens.** *Infect Immun.* 2000; 68 (5): 2797–803
- Ritelli M, Amadori M, Tagliabue S, Pacciarini ML. **Use of a macrophage cell line for rapid detection of *Mycobacterium bovis* in diagnostic samples.** *Vet Microbiol.* 2003; 94: 105-120.
- Rosenthal KS & Zimmerman DH. **Vaccines: All things considered.** *Clin Vaccine Immunol.* 2006; 13 (8): 821-829
- Russell WMS. & Burch RL. **The Principles of Humane Experimental Technique.** London: Methuen. Smyth, D. 1959. 238 pp.
- Saalmüller A. **New understanding of immunological mechanisms.** *Vet Microbiol.* 2006; 117 (1): 32-8.
- Sander B. Skansén-Saphir, Damm O, Hakansson L, Andersson J, Andersson U. **Sequential production of Th1 and Th2 cytokines in response to live bacillus Calmette-Guerin.** *Immunology.* 1995, 86 (4): 512–8
- Santiago ACC. **Correlação entre a colonização pelos isolados clínicos de *Mycobacterium avium* e a imunidade celular específica a antígenos micobacterianos em pacientes HIV-1 positivos.** Rio de Janeiro 2003. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] FIOCRUZ.
- Santos JPS. **Avaliação da estabilidade estrutural e funcional de vetores plasmidiais recombinantes bifuncionais (*Escherichia coli* – *Mycobacterium*) em *Mycobacterium bovis* BCG.** Rio de Janeiro; 2002. Mestrado [Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes] – Universidade Federal do Rio de Janeiro
- Serruto D & Rappuoli R. **Post-genomic vaccine development.** *FEBS Lett.* 2006, 580: 2985–2992.
- SLIPE – Sociedade Latinoamericana de Infectologia Pediátrica & API – Associação Panamericana de Infectologia. **Manual de Vacinas da América Latina.** Madrid: Euro RSCG Life Esquema, 2005. 620 pp.
- Smith KC & Starke JR. Bacille Calmette-Guérin vaccine. In: Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines.** 4ª ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2004 p. 179–210
- Smith SG, Patel PM, Selby PJ, Jackson AM. **The response of human dendritic cells to recombinant adenovirus, recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus**

Calmette Guerin and biolistic methods of antigen delivery: different induction of contact-dependant and soluble signals. Immunol Lett. 2001; 76 (2): 79-88.

Standiford TJ. **Anti-inflammatory cytokines and cytokine antagonists.** Curr Pharm Des. 2000, 6 (6): 633-49.

Stokes RW & Doxsee D. **The receptor-mediated uptake, survival, replication, and drug sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* within the Macrophage-like cell line THP-1: A comparison with human monocyte-derived macrophages.** Cell Immunol. 1999; 197: 1-9

Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, Bennett LT, Bansal GP, Young JF, Lee MH, Hatfull GF, Snapper SR, Barletta RG, Jacobs WR, Bloom RR. **New use of BCG for recombinant vaccines.** Nature. 1991, 351: 456-460.

Takahashi H. **Antigen presentation in vaccine development.** Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2003, 26 (5-6): 309–28

Tendler M, Brito CA, Vilar MM, Serra-Freire N, Diogo CM, Almeida MS, Delbem ACB, Silva JF, Savino W, Garrat RC, Katz N, Simpson AJG. **A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine.** Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93: 269–273

Theus SA, Cave MD & Eisenach KD. **Activated THP-1 cells: an attractive model for the assessment of intracellular growth rates of *Mycobacterium tuberculosis* isolates.** Infect Immun. 2004; 72(2): 1169-1173

_____. **Intracellular macrophage growth rates and cytokine profiles of *Mycobacterium tuberculosis* strains with different transmission dynamics.** Infect Dis. 2005; 191 (3): 453–60

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. **Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1).** Int. J. Cancer. 1980; 26: 171-176

Varaldo PB, Leite LCC, Dias WO, Miyaji EN, Torres FIG, Gebara VC, Armôa GRG, Campos AS, Matos DCS, Winter N, Gicquel B, Vilar MM, McFadden J, Almeida MS, Tendler M, McIntosh D. **Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* protects mice from cercarial challenge.** Infect Immun. 2004; 72(6): 3336-3343

Varaldo PB, Miyaji EN, Vilar MM, Campos AS, Dias WO, Armôa GRG, Tendler M, Leite LCC, McIntosh D. **Mycobacterial codon optimization of the gene encoding the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* in recombinant *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin enhances protein expression but not protection against cercarial challenge in mice.** FEMS Immunol Med Microbiol. 2006, 48 (1): 132-139.

Wack A & Rappuoli R. **Vaccinology at the beginning of the 21st century.** Curr Opin Immunol. 2005, 17 (4): 411– 418

WHO. *World health organization*. **TDR Progress: New and Improved Tools - New candidates in development: vaccine development schistosomiasis**. Geneva: 2000. [capturado em 16 de outubro de 2004]. Disponível em: <http://who.int/tdr/research/progress9900/tools/vaccine-schistossomiasis.htm>.

_____. **Global Plan to stop tuberculosis 2006-2015**. Geneva: WHO Press. 2006: 1-17

Wynn TA & Hoffmann KF. **Defining a schistosomiasis vaccination strategy – it is really Th1 versus Th2?** *Parasitol Today*. 2000; 16, (11): 497–501.

Xia HH, Lam SK, Chan AO, Lin MC, Kung HF, Ogura K, Berg DE, Wong BC. **Macrophage migration inhibitory factor stimulated by *Helicobacter pylori* increases proliferation of gastric epithelial cells**. *World J Gastroenterol*. 2005, 11 (13): 1946–1950

Xing Z, Zganiacz A & Santosuosso M. **Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF-alpha and nitric oxide from macrophages via IFN-gamma induction**. *J Leukoc Biol*. 2000; 68: 897-902.

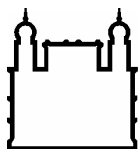
Zhao G, Etherton TD, Martin KR, Vanden Heuvel JP, Gillies PJ, West SG, Kris-Etherton PM. **Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells**. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 336 (3): 909–917.

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE AVALIAÇÃO DE
PROTÓTIPOS VACINAIS EM LINHAGEM DE MONÓCITO HUMANA
(THP-1)**

DANILO PARMERA

RIO DE JANEIRO
2007



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

DANILO PARMERA

**Desenvolvimento de um modelo de avaliação de protótipos
vacinais em linhagem de monócito humana (THP-1)**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos

RIO DE JANEIRO
2007

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas / ICICT / FIOCRUZ - RJ

P253 Parmera, Danilo

Desenvolvimento de um modelo de avaliação de protótipos vacinais em
linhagem de monócito humana (THP-1) / Danilo Parmera. – Rio de Janeiro,
2007.

xiii, 64 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos,
Tecnologia em Imunobiológicos, 2007.

Bibliografia: f. 56-64.

1. THP-1. 2. Vacina BCG. 3. Sm-14. 4. Vacina – Protótipo. 5. Citocinas.
I. Título.

CDD: 615.372

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico, Laboratório de Tecnologia Recombinate e no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Departamento de Micro-Imuno e Parasitologia, Serviço de Imunologia, Laboratório de Imunologia Celular, sob a orientação do Prof. Dr. Geraldo Rodrigues Garcia Armoa e Prof Dra. Maria da Glória Bonecini de Almeida.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

DANILO PARMERA

**Desenvolvimento de um modelo de avaliação de protótipos
vacinais em linhagem de monócito humana (THP-1)**

ORIENTADORES: Prof. Dr. Geraldo Rodrigues Garcia Armôa
Profª. Drª. Maria da Glória Bonecini de Almeida

Examinadores:

Prof. Dr. Douglas McIntosh – Bio-Manguinhos – Presidente

Profª. Drª. Cynthia Silveira Horn – IPEC/FIOCRUZ

Prof. Dr. Walter Martin Roland Oelemann – IMPPG/UFRJ

Rio de Janeiro

Dedico esta Dissertação a Deus,

pele dom da vida.

a minha família

pele carinho e apoio na minha trajetória,

à minha noiva, Fernanda,

pele amor.

AGRADECIMENTOS

À FIOCRUZ, em nome de seu presidente Dr. Paulo Marchiori Buss, por proporcionar a excelência na produção de fármacos e imunobiológicos e no desenvolvimento científico de nosso país.

À Bio-Manguinhos, em nome do seu diretor Dr. Akira Homma, pela oportunidade e condições propiciadas à realização de uma pós-graduação profissional.

Ao IPEC, em nome da sua diretora Dra. Valdiléa Gonçalves Veloso, pelas condições propiciadas à realização da minha dissertação.

Ao orientador e amigo Prof. Dr. Geraldo Rodrigues Garcia Armôa por acreditar no meu potencial, pelos valorosos ensinamentos, apoio incondicional e incentivo aos trabalhos realizados.

À orientadora e amiga Prof^a. Dr^a. Maria da Glória Bonecini de Almeida pelas portas abertas de seu laboratório, possibilitando a execução deste trabalho e pela sincera atenção com que sempre me recebeu e pelo exemplo de pesquisadora.

Aos Professores, Coordenadora e Secretária do MPTI, que muito contribuíram na minha valorização humana e aos meios acadêmicos para ingresso, manutenção e término do curso.

À Dr^a. Cynthia Silveira Horn, pelas importantes contribuições durante a realização deste trabalho, em especial o experimento de proliferação celular.

Ao Dr. Douglas MacIntosh, pelas importantes contribuições durante a realização deste trabalho, em especial no auxílio na realização dos ensaios de *western blotting*, no cultivo das amostras de BCG e na revisão deste manuscrito.

Aos amigos Ana Paula Argondizzo, João Pedro Souza Santos, Gabriela dos Santos Esteves, Dilzamar Velloso do Nascimento, Dr. José Procópio Senna, Dr. Marco Antônio Medeiros, Natália Plínio dos Santos, Dra. Elezer Monte Blanco Lemes, Camilla Bayma, Dra. Ana Carolina Góes pelo companheirismo, amizade, solidariedade e apoio pessoal e profissional.

À amiga Maria Luiza Azevedo pela amizade, eficiência, disponibilidade de auxílio em todos os momentos e palavras reconfortantes nos momentos de desespero.

À doutoranda e amiga Ana Teresa Fernandes pela alegria e disposição no auxílio dos experimentos de imunocitoquímica

Aos tecnologistas e amigos Andréia Lamoglia e Márcio Mantuano pelo auxílio na realização dos experimentos realizados no citômetro de fluxo.

À amiga Larissa Catharina Costa pela colaboração e dedicação nos experimentos infinitos e pelos momentos divertidos no laboratório.

Ao amigo Dyego Carletti pelo auxílio no experimento de proliferação celular.

Aos colaboradores e amigos do Serviço de Imunologia, Dra. Liane Castro, Carla Bial, Márcia Andrade, Millena Rosalba, Ana Cristina Santiago Leandro, Marcelo Leandro, Leonardo Gatto, Silvia Silva, Regina Pimenta, Maristela Lima, Monique Lima e a equipe do laboratório de Imunodiagnóstico pelo companheirismo e apoio.

Aos companheiros do Mestrado Profissional, no qual dividimos boa parte de nossas manhãs, pela cooperação e companheirismo.

Aos parentes e amigos pelos momentos de descontração, conversas, apoio, amizade, alegrias e tristezas compartilhadas. (por serem muitos não serão citados, mas estarão sempre em minha memória)

A todas as pessoas que não foram nominalmente mencionadas, mas que contribuíram para viabilizar este trabalho.

E, finalmente, a Deus, que proporcionou a mim e a minha família os meios possíveis para alcançar a felicidade.

"ESPERE O MELHOR, PREPARE-SE PARA O PIOR E ACEITE O QUE VIER."

Provérbio Chinês

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	lx
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3. METODOLOGIA.....	15
3.1 Cultivo da célula THP-1.....	15
3.2. Cultivo das cepas de BCG.....	16
3.3 Avaliação da expressão da proteína recombinante Sm14 em BCG/ <i>sm14</i>	17
3.4 Padronização da multiplicidade de infecção (MOI) do BCG-P.....	18
3.5 Infecção com BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles em células THP-1.....	19
3.6 Avaliação da capacidade de proliferação celular da célula THP-1.....	19
3.7 Avaliação da estabilidade funcional (expressão do gene <i>kanR</i>) do vetor de expressão pAU5 dos BCGr.....	20
3.8 Protocolo de imunocitoquímica para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1.....	20
3.9 Protocolo de citometria de fluxo para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1.....	22
4. RESULTADOS.....	24
4.1 Cultivo da célula THP-1.....	24
4.1.1 Meios de cultivo.....	24
4.1.2 Manutenção.....	24
4.2. Cultivo das cepas de BCG.....	25
4.3 Expressão da proteína Sm14 pelo BCG/ <i>sm14</i>	26
4.4 Multiplicidade de infecção (MOI) BCG:THP-1	26

4.5 Capacidade de proliferação da célula THP-1 infectada pelo BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles.....	29
4.6 Avaliação da viabilidade e estabilidade funcional (expressão do gene <i>kanR</i>) do BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles recuperados de células THP-1	30
4.7. Avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles em células THP-1 por imunocitoquímica	31
4.8 Avaliação das citocinas a partir da infecção com BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles em células THP-1 por Citometria de Fluxo	34
4.9 Comparação entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo.....	39
4.9.1 Detecção de IL-10.....	39
4.9.2 Detecção de IL-12.....	41
4.9.3 Detecção de TNF- α	43
5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÕES	54
7. PERSPECTIVAS	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	grau Celsius
μCi	micro Curie
μL	Microlitro
μg	Micrograma
ADC	Albumina – Dextrose – Catalase
APC	<i>Antigen presenting cells</i> – célula apresentadora de antígenos
API	Associação Panamericana de Infectologia
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATLA	<i>Alternatives to Laboratory Animals</i>
BCG	<i>Mycobacterium bovis</i> Bacilo Calmette-Guérin
BCG-P	<i>M. bovis</i> Bacilo Calmette-Guérin sub-cepa Pasteur 1173P2
BCGr	<i>M. bovis</i> Bacilo Calmette-Guérin recombinante
BCG/pAU5	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepa Pasteur transformado o vetor de expressão pAU5
BCGr/pPL73-sm14	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepa Pasteur 1173P2 transformado com vetor de expressão pPL73 contendo o gene <i>sm14</i> de <i>S. mansoni</i>
BCG/sm14	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepa Pasteur 1173P2 transformado com o vetor de expressão pAU5 contendo o gene <i>sm14</i> de <i>S. mansoni</i>
Bio-Manguinhos	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
BP	<i>Band pass</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i> – grupo de diferenciação 4
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i> – grupo de diferenciação 8
cm ²	Centímetro quadrado
CMI	<i>Cell-mediated immunity</i> – Imunidade mediada por células
Com	Contagem por minuto
CO ₂	Gás carbônico
CpG	Dinucleotídeo formado pela ligação fosfodiéster de citosina com guanina na mesma fita de DNA
CTFA	<i>Cosmetic, Toiletries and Frangrance Association</i>

DAB	3-3' diaminobenzidina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> – Meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> – Ácido desoxirribonucleico
Dr(a).	Doutor(a)
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECVAM	<i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i>
EUA	Estados Unidos da América
FABP	<i>Fatty acid binding protein</i> - Proteína ligante a ácidos graxos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> – Isotiocianato de fluoresceína
FL	Análise de fluorescência (citometria de fluxo)
FRAME	<i>Fund for Replacement of Animal Medical Experiments</i>
FSC	<i>Foward angle light scatter</i>
g	Gramma
<i>g</i>	Aceleração gravitacional
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i> – Solução salina de Hank
HEPES	Acido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IFN	Interferon
IMPPG	Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
IRAG	<i>Interagency Regulatory Alternatives Group</i>
Kan	Canamicina
<i>KanR</i>	Gene de resistência à canamicina derivado do Tn903
kDa	Kilodaltons
LATER	Laboratório de Tecnologia Recombinante
log	Logaritmo
log ₁₀	Logaritmo na base 10
LPS	Lipopolissacarídeo

LSAB	<i>Labeled StreptAvidin Biotin</i>
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
M1	Macrófago tipo 1
M2	Macrófago tipo 2
MDM	<i>Monocyte-derived macrophage</i> – Macrófago derivado de monócito
MEM	<i>Minimum essential medium of Eagle</i> – Meio mínimo essencial de Eagle
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> - Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitro
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> – Multiplicidade de infecção
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Msc	Mestre
nº	Número
ng	Nanograma
NIAID	<i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i> - EUA
NK	<i>Natural killer cells</i> – Células matadoras naturais
nm	Nanômetro
O ₂	Gás oxigênio
OADC	Ácido oléico – Albumina – Dextrose – Catalase
<i>oriE</i>	Origem de replicação do bacteriófago T4 de <i>Escherichia coli</i>
<i>oriM</i>	Origem de replicação do plasmídeo pAL5000 de <i>Mycobacterium fortuitum</i>
PA	<i>pro analisis</i> - para análise
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> – Padrões moleculares associados ao patógeno
PAPES	Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde
pAU5	Vetor de expressão citoplasmático
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> - Células mononucleares do sangue periférico
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> - Salina tamponada de fosfato

PBS-T	<i>Phosphate-buffered saline Tween20</i> - Salina tamponada de fosfato com Tween20
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
PE	<i>Phycoerythrin</i> - Ficoeritrina
pH	Potencial hidrogenionico
<i>Phsp60*</i>	Promotor <i>hsp60</i> de <i>Mycobacterium bovis</i> BCG modificado
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
POPOP	p-bis[2(5-. feniloxazoil)]-benzeno
PPO	2,5-difeniloxazol
Prof(a)	Professor (a)
PRR	<i>Pattern-recognition receptors</i> – Receptores de reconhecimento padrão
R1	Região de análise (citometria de fluxo)
Reg	Registro
rpm	Rotação por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> – Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SFB	Soro fetal bovino
SLIPE	Sociedade Latinoamericana de Infectologia Pediátrica
Sm14	Proteína de <i>Schistosoma mansoni</i>
Sm14r	Proteína recombinante de <i>S. mansoni</i> expressa em <i>E. coli</i>
<i>sm14</i>	Gene de <i>S. mansoni</i>
SSC	<i>Side angle light scatter</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> – Salina tamponada de Tris
TBS-T	<i>Tris-buffered saline Tween 20</i> – Salina tamponada de Tris com Tween 20
Tc	<i>T cytotoxic cell</i> – Célula T citotóxica
TCR	<i>T cell receptor</i> – receptor de célula T
TDR	<i>Special programme for research and training in tropical disease</i>

TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i> - Fator transformador de crescimento beta
Th	<i>T helper cell</i>
Th1	<i>T helper cell type 1</i> – Célula T auxiliar tipo 1
Th2	<i>T helper cell type 2</i> – Célula T auxiliar tipo 2
Timidina-H ³	Timidina tritiada
TLR	<i>Toll like receptor</i> – Receptor do tipo Toll
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alfa</i> - Fator de necrose tumoral alfa
TPA	12-O-tetradecanolforbol-13-acetato
Treg	<i>T regulatory cell</i> – Célula T regulatória
UFC	Unidades formadoras de colônias por mililitro
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
v	Volume
WHO	<i>World Health Organization</i> – Organização Mundial da Saúde
x	Vezes

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Características das cepas de BCGs	16
Tabela 3.2: Anticorpos utilizados no protocolo de imunocitoquímica.....	21
Tabela 3.3: Anticorpos utilizados no protocolo de citometria de fluxo.....	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Visão esquemática da indução do sistema imune gerada por um patógeno ou uma vacina.....	08
Figura 1.2: Diagrama do modelo molecular da proteína Sm14.....	11
Figura 4.1: Microscopia óptica (200 x) de células THP-1, após três passagens, mantidas em meio RPMI 1640 preparado com 0,2% de NaHCO ₃ e suplementado com 10% de SFB.....	24
Figura 4.2: Cultura de <i>M. bovis</i> BCG Pasteur cultivado em meio 7H11 suplementado com 10% de OADC.....	25
Figura 4.3: Expressão da proteína Sm14 produzida pelos quatro clones de BCG/ <i>sm14</i> utilizados nos experimentos de infecção.....	26
Figura 4.4: Expressão de IL-10, IL-12 e TNF- α em células THP-1 infectadas com BCG-P.....	28
Figura 4.5: Atividade proliferativa das células THP-1 infectadas pelo BCG/ <i>sm14</i> e pelos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5)	29
Figura 4.6: Cinética da viabilidade do protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e dos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5) recuperados de células THP-1 e cultivados nos meios Middlebrook 7H11 7H11/Kan.....	31
Figura 4.7: Microscopia óptica (1000 x) de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após 24 horas de infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), detectadas por imunocitoquímica.....	32
Figura 4.8: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica.....	33
Figura 4.9: Determinação da região de análise das células THP-1 mantidas em cultivo celular.....	34

Figura 4.10: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 TNF- α e após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	35
Figura 4.11: Gráfico tamanho (FSC) <i>versus</i> fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	36
Figura 4.12: Gráfico tamanho (FSC) <i>versus</i> fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	37
Figura 4.13: Gráfico tamanho (FSC) <i>versus</i> fluorescência (FL1 ou FL2) da avaliação de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	38
Figura 4.14: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria de fluxo.....	40
Figura 4.15: Percentagem de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria.....	42
Figura 4.16: Percentagem de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria.....	44
Figura 5.1: Modelo esquemático das etapas necessárias para implantação de novos fármacos e imunobiológicos.....	47

RESUMO

As culturas de células vêm sendo utilizadas extensivamente no desenvolvimento e na produção de uma variedade de produtos terapêuticos e profiláticos, tornando-se uma ferramenta indispensável para geneticistas, imunologistas, vacinologistas e a indústria farmacêutica. A adoção de sistemas de ensaios celulares *in vitro* tem sido aplicada como um método alternativo para a substituição ou diminuição do uso de animais nas fases de desenvolvimento, produção e testes de vacinas, demonstrando resultados promissores. Da mesma forma, sistemas computacionais podem ampliar a utilização desta ferramenta para etapas do desenvolvimento de vacinas candidatas na fase pré-clínica. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um protocolo *in vitro* utilizando culturas de células humanas - a linhagem de monócitos THP-1, para a seleção de um protótipo vacinal - a cepa Pasteur de *Mycobacterium bovis* BCG expressando o antígeno Sm14 de *Schistosoma mansoni* (BCG/sm14). Para isso foram empregadas duas metodologias – citometria de fluxo e imunocitoquímica, para a identificação do perfil da expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α . Foram utilizados como controles a cepa Pasteur do *M. bovis* BCG e a construção da cepa Pasteur do *M. bovis* BCG contendo o vetor de expressão pAU5 (BCG/pAU5). Após padronização, a multiplicidade de infecção utilizada para os experimentos foi de 10 bacilos para 1 célula THP-1 (10MOI). A expressão da proteína Sm14 foi detectada em todos os protótipos vacinais. Para assegurar que o protótipo BCG/sm14 era capaz de diferenciar a linhagem de monócitos THP-1 em macrófagos, avaliamos a taxa de crescimento celular e foi possível observar que após a infecção estas células apresentavam o índice de proliferação diminuído em 2 logs em relação à célula não infectada. O protótipo vacinal BCG/sm14 não mostrou diferenças quanto a capacidade de infecção, a taxa de persistência intracelular e a estabilidade da construção plasmidial. As duas metodologias empregadas mostraram resultados discrepantes em relação ao percentual de citocinas expressas após a infecção com o protótipo vacinal ou os BCG controles, mostrando um maior percentual de células positivas quando avaliados por citometria de fluxo. Contudo, mesmo com esta diferença observamos que o protótipo vacinal BCG/sm14 não alterou o perfil de expressão de IL-10, IL-12 e TNF- α . O fato do plasmídeo pAU5 ser um vetor de expressão citoplasmática, sugere que a proteína Sm14 não foi capaz de estimular a mudança de citocinas em monócitos humanos. Experimentos futuros devem investigar o papel do BCG/sm14 em macrófagos maduros, quanto a indução de citocinas pró e anti-inflamatórias, TLR, bem como na indução da resposta imune adaptativa, como a apresentação antigênica, na tentativa de melhor entender a resposta imune a esta vacina candidata.

ABSTRACT

Cell cultures has been used extensively in the development of a broad range of therapeutic and prophylactic products, and are an important tool for geneticists, immunologists, vaccinologists and the pharmaceuticals industry. *In vitro* cell assay has been applied as an alternative method to replace or diminish the use of animal model in the developmental, production in vaccine test phases, with promising results. Otherwise, computational methods should amplify the use of cell cultures tools to test candidate vaccines. The main goal of this work was to develop an *in vitro* protocol using human cell line – monocytic cell THP-1, to select a vaccine prototype – strain Pasteur *Mycobacterium bovis* BCG expressing *Schistosoma mansoni* Sm14-antigen (BCG/sm14). Two methodologies were employed – a flow cytometry and immunocytochemistry, to quantify the expression of IL-10, IL-12 e TNF- α . Pasteur *M. bovis* BCG and the strain Pasteur do *M. bovis* BCG containing the expression vector pAU5 (BCG/pAU5) were used as controls. Multiplicity of infection (MOI) was determined and showed a better 10 bacilli to 1 cells ratios, regarding the expression of intracellular cytokines. Sm14 protein expression was detected in all vaccine prototype before use. To assure that BCG/sm14 was able to differentiate monocytic THP1 cell line in mature macrophage, we evaluated the proliferative ration after BCGs infection and all strain showed the ability to induce monocytic THP1 cells maturation, diminishing in 2.0 logs the cell proliferation. No differences were seen in the uptake, intracellular persistence and plasmidial stability. Interestingly, we observe discrepant results regarding the amount of positive cells expressing cytokines detected by the two methods used, independent of which BCG was tested. The overall results obtained by the cytometric method was high than immunocytochemistry. However, beside these ambiguous results, no alteration in the IL-10, IL-12 and TNF-alfa profile was observed when BCG/sm14 was compared with BCG. These results point to the plasmidial BCG construction pAU5 and its intracellular expression, suggesting no modification in the cytokine profile in human monocytic cell lines. Further experiments should be addressed to identify the role of BCG/sm14 in modulate mature macrophage and, the induction of adaptive immune response, as antigen presentation, pro- and anti-inflammatory cytokines, TLR expression and activation, to better understating the vaccine prototype immune response .

1. INTRODUÇÃO

A vacinologia é uma ciência combinatória que estuda a diversidade de agentes patogênicos, o sistema imune humano e preparações vacinais que possam modular a resposta imune para prevenir ou curar as doenças causadas por esses patógenos (Brusic, August & Petrovsky 2005). Sendo a vacina um imunógeno não-patogênico que ao ser inoculado em um indivíduo é capaz de induzir imunidade protetora contra um patógeno específico (Parslow 2004), a vacinação, bem como a limitação à exposição de pessoas saudáveis às infectadas e eliminação da fonte ou meios de disseminação do agente infeccioso, contribui para a prevenção de doenças. As propriedades necessárias para uma vacina ideal são: promover imunidade ao longo da vida, ser largamente protetora contra todas as variantes do patógeno, prevenir a transmissão de doença, induzir a imunidade rapidamente, ser eficaz em todas as pessoas vacinadas, transmitir a proteção materna ao feto, possuir baixo custo, ser estável, ser segura e necessitar de poucas ou, de maneira ideal, uma só administração que induza proteção. (Ada 2001, Beverley 2002, NIAID 2003).

O desenvolvimento das vacinas ao longo da história pode ser destacado de acordo com as revoluções tecnológicas aplicadas na vacinologia (Plotkin 2005a). No final do século XVIII o médico inglês Edward Jenner realizou a experiência que foi considerada o marco da imunologia como ciência. Jenner inoculou, a partir de arranhões feitos no braço de um menino de oito anos (James Phipps), o líquido extraído da vesícula causada pela varíola bovina da mão da ordenhadeira Sarah Nelmer (André 2003, Plotkin & Plotkin 2004). Contudo, somente quase um século após a descoberta de Jenner, Louis Pasteur desenvolveu o conceito que levaria à primeira revolução da vacinologia: a atenuação da virulência de patógenos, criando a primeira vacina em laboratório e instituindo o conceito de vacinação. Pasteur estabeleceu as bases do que ficou conhecida como abordagem clássica para o desenvolvimento de vacinas, que incluem o isolamento do patógeno, a perda da virulência (atenuação) e a imunização com partes do microrganismo ou o microrganismo inteiro (Plotkin & Plotkin 2004, Plotkin 2005b, Serruto & Rappuoli 2006).

No final do século XVIII, Salmon e Smith descreveram o conceito que levaria a segunda revolução tecnológica da vacinologia, a inativação do patógeno para o desenvolvimento de preparações vacinais. A expansão deste conceito levou a

construção de vacinas feitas a partir de toxinas detoxificadas (toxóides) e frações subcelulares como polissacarídeos, proteínas e conjugados (Plotkin & Plotkin 2004, Plotkin 2005a, Plotkin 2005b). A adaptação de cultura de células para o cultivo de vírus visando a obtenção de preparações vacinais foi considerada a terceira grande revolução tecnológica utilizada pela vacinologia (Plotkin & Plotkin 2004, Plotkin 2005a, Plotkin 2005b). A introdução de novas estratégias para o desenvolvimento de vacinas a partir da utilização de técnicas de biologia molecular como: clonagem de genes e expressão de proteínas recombinantes, criação de partículas defectivas, desenvolvimento de vetores vivos atenuados, sequenciamento de genomas, genômica comparativa, proteômica e vacinologia reversa; abriram novas fronteiras na vacinologia para a busca de preparações imunogênicas que sejam efetivas no combate às doenças infecciosas. Essa nova onda de desenvolvimento está sendo considerada como a quarta revolução tecnológica da vacinologia (Ellis 2004, Plotkin 2005a, Plotkin 2005b, Serruto & Rappuoli 2006).

A compreensão e a importância da resposta imune após a vacinação sofreram um avanço notável nos últimos anos (Saalmüller 2006), marcando assim uma nova era para o desenvolvimento de vacinas. Para Plotkin (2005b), o novo foco dos vacinologistas está no desenvolvimento de meios, como vetores, replicons, lipopeptídeos e adjuvantes que dirijam a polarização do sistema imune para uma resposta do tipo 1, ou seja, a estimulação da imunidade celular. Plotkin destaca também o desenvolvimento de novas rotas de imunização tais como intranasal, aerossol, transcutânea, oral e retal (Plotkin 2005b). Já para Rappuoli (2004), a vacinologia atual está focada no processo de obtenção de imunógenos a partir da investigação pan-genômica, análise por microarranjos de DNA (DNA *microarray*) e proteômica, numa abordagem conhecida como vacinologia reversa. Serruto e Rappuoli (2006) enfatizam que o futuro do desenvolvimento de vacinas está na chamada vacinologia estrutural, na qual através da resolução atômica e da estrutura dos antígenos potenciais, será realizado o desenho racional dos epítomos alvos usados como candidatos vacinais. Observa-se então que a integração entre a tecnologia básica, os avanços tecnológicos na biologia molecular e o aumento do entendimento da resposta imune são a base para o desenvolvimento de novos candidatos a preparações vacinais (Rosenthal & Zimmerman 2006).

A imunidade, ou resposta imune, pode ser dividida em dois tipos: a imunidade inata e a imunidade adquirida ou adaptativa. A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa contra agentes patogênicos e consiste no desencadeamento de

mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que já existiam antes do estabelecimento de uma infecção e que atuam da mesma forma em infecções sucessivas. As barreiras anatômicas (pele e epitélio de mucosa), barreiras fisiológicas (temperatura, áreas com baixo pH, mediadores químicos), fagócitos mono e polimorfonucleares e barreiras inflamatórias são parte da imunidade inata (Parslow 2004, Abbas & Lichtman 2005b, McCullough & Summerfield 2005). As células da imunidade inata utilizam receptores de reconhecimento padrão (*pattern-recognition receptors* – PRR) do tipo Toll (*Toll like receptors* - TLRs) para o reconhecimento de estruturas microbianas altamente conservadas que não estão presentes em células de mamíferos, como padrões moleculares associados ao patógeno (*pathogen-associated molecular patterns* – PAMPs). Os TLRs possuem a capacidade de reconhecer diferentes PAMPs, como seqüências CpG de DNA não metiladas, lipídeos e carboidratos complexos como lipopolissacarídeos (LPS) e ácidos teicóicos (Reis e Sousa 2004b, Krutzik *et al.* 2005, Rosenthal & Zimmerman 2006).

A imunidade adaptativa caracteriza-se por sua alta especificidade e por ampliar a magnitude da resposta após sucessivas exposições a um determinante antigênico. Além dos muitos mecanismos da imunidade natural necessários à eliminação dos microorganismos invasores, a imunidade adaptativa utiliza a seleção e a mutação somática na geração de seu repertório imune desenvolvendo duas outras propriedades adicionais: a memória em relação aos contatos anteriores com um determinado antígeno, de modo que as exposições subseqüentes estimulem respostas de defesa gradativamente mais efetivas, e a capacidade de amplificar os mecanismos protetores da imunidade natural, direcionando-os para os locais de entrada do antígeno e melhorando o processo de eliminação dos elementos estranhos ao organismo hospedeiro (Costa-Carvalho & Solé 2000). A imunidade adaptativa é classificada como humoral ou celular em função do componente do sistema imunológico intermediador da resposta imune. A imunidade humoral é mediada por anticorpos, que são capazes de efetuar o reconhecimento específico agindo na neutralização de microorganismos e toxinas, na ativação do sistema do complemento e na opsonização de antígenos para aumento da fagocitose. A imunidade celular ou mediada por células (*cell-mediated immunity* – CMI) refere-se à resposta imune efetora das células T atuando na ativação de fagócitos, estimulação das atividades microbicidas dos macrófagos, células T e células *natural killer* (NK) na destruição de células infectadas. A CMI atua na defesa contra microorganismos

intracelulares, na imunidade antitumoral e na rejeição de aloenxertos (Parslow 2004, McCullough & Summerfield 2005).

As células T podem ser classificadas em dois grandes grupos de acordo com a expressão dos antígenos de superfície: T CD4 e T CD8. As células T CD8 efetoras são funcionalmente conhecidas como células T citotóxicas (T *cytotoxic* – Tc). As células Tc atuam principalmente na lise de células infectadas com patógenos presentes em seu citoplasma, desempenhando sua função através da liberação de dois tipos de citotoxinas: as granzimas, que são capazes de induzir apoptose na célula-alvo e as perforinas, que perfuram a membrana celular da célula-alvo facilitando a ação das granzimas (Esser *et al.* 2003, Kaufmann & Flynn 2005). Já as células T CD4 efetoras são funcionalmente conhecidas como células T auxiliares (T *helper* – Th). As células Th desempenham um papel central na função de vários processos como ativação, inibição, regulação, diferenciação e proliferação de diferentes tipos celulares como as células T CD8, células B, células NK, eosinófilos e macrófagos, tanto por contato célula-célula como pela produção de citocinas (Esser *et al.* 2003, Kidd 2003). As células Th são divididas principalmente em duas sub-populações fenotipicamente distintas, T *helper* tipo 1 (Th1) ou T *helper* tipo 2 (Th2), que proporcionam a estruturação de um modelo útil na compreensão da imunorregulação dependente de célula T (Mosmann & Coffman 1989, Mosmann 1991, McCullough & Summerfield 2005).

O conceito de células Th1/Th2 baseia-se na dicotomia do perfil de citocinas expressas, uma vez que cada sub-população de célula Th amplifica a si mesma e promove a regulação cruzada da sub-população recíproca. As citocinas produzidas por células Th1 são reconhecidamente capazes de suprimir a proliferação celular, a síntese de citocinas e/ou a atividade biológica induzidas por citocinas da resposta Th2, e vice-versa. Nas respostas imunes geradas pelas células Th1 as principais citocinas produzidas são as interleucinas (IL) 2 e o interferon gama (IFN- γ) direcionando o sistema imune para uma resposta mediada por células. A produção de anticorpos não é uma característica proeminente da resposta Th1, mas sua combinação com a resposta celular é necessária no combate de infecções intracelulares e fúngicas e de células cancerosas através de mecanismos diretos (destruição de células infectadas) e indiretos como a ação do interferon na proteção de células não infectadas (Esser *et al.* 2003, Kidd 2003, Rosenthal & Zimmerman 2006). Já as respostas imunes geradas pelas células Th2 são especialmente eficazes contra parasitas extracelulares e toxinas por mecanismos dependentes de

anticorpo e as citocinas dominantes produzidas são IL-4, IL-5, IL-10, e IL-13, direcionando para uma alta produção de anticorpos (Esser *et al.* 2003, Kidd 2003, Clingan *et al.* 2006, Rosenthal & Zimmerman 2006).

As células T não possuem receptores capazes de reconhecer diretamente antígenos. Os receptores de antígenos das células T (*T cell receptors* – TCRs) reconhecem somente fragmentos de antígenos expostos na superfície de outras células associados principalmente a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (*Major histocompatibility complex* - MHC). Há dois tipos principais de moléculas de MHC, denominadas de moléculas de MHC de classe I e moléculas de MHC de classe II e seu padrão de expressão está intimamente ligado às funções das células T. As moléculas MHC de classe I são expressas por todas as células do organismo exceto hemácias, sendo complexadas a antígenos encontrados no citoplasma celular e reconhecidas pelas células Tc. As moléculas MHC de classe II são expressas principalmente por células especializadas conhecidas como células apresentadoras de antígenos (*antigen presenting cells* – APC), que apresentam antígenos oriundos de vesículas endocíticas as células Th (Esser *et al.* 2003).

As APCs são células especializadas na captura de microorganismos e outros antígenos, na apresentação desses antígenos às células T e na expressão de sinais que estimulam a proliferação e diferenciação de linfócitos (Takahashi 2003, Abbas & Lichtman 2005b), possuindo um papel crucial na interação entre as imunidades inata e adaptativa. Seus principais representantes são as células dendríticas, os linfócitos B e os macrófagos (Guermonprez *et al.* 2002, Abbas & Lichtman 2005b). As células dendríticas são conhecidas como APCs profissionais por possuírem como função a captura e a apresentação de antígenos às células T virgens, promovendo juntamente com sinais co-estimulatórios, a expansão clonal e a diferenciação em células T efetoras (Guermonprez *et al.* 2002, Takahashi 2003, Reis e Sousa 2004a). As células B, dentre outras funções, são capazes de apresentar antígenos às células T efetoras sendo essenciais para a produção de anticorpos dependentes de células Th (Parlow 2004).

Os macrófagos são células fagocitárias mononucleadas, derivados dos monócitos sanguíneos e são encontrados nos tecidos desempenhando importantes papéis nas respostas imunes inata e adquirida. Possuem um papel central na resposta inicial à infecção antes da ação da imunidade mediada pelas células T e B, sendo importantes na fase de indução de inflamação, reorganização e reparo dos

tecidos, além de realizarem funções efetoras. São classificados como células apresentadoras de antígenos e têm diversas atividades, como atividade antimicrobiana e antitumoral, modulação de várias células, e promoção de quimiotaxia (Auwerx 1991, Mills *et al.* 2000, Berges *et al.* 2005).

Os macrófagos foram denominados M1 e M2 de acordo com o seu padrão de ativação (Mills *et al.* 2000). Assim, macrófagos M1 provenientes de células Th1 apresentam uma resposta efetora caracterizada pela produção dominante de óxido nítrico (NO) em resposta ao LPS ou IFN- γ exógeno. Macrófagos M2, de linhagens Th2, por sua vez, exibem um perfil tolerante caracterizado pela produção de altos níveis de fator transformador de crescimento beta (*transforming growth factor beta* - TGF- β) (Bastos *et al.* 2002, Mantovani, Sica & Locati 2005). O padrão de ativação assumido por esses macrófagos parece ser independente de linfócitos, uma vez que macrófagos de camundongos apresentam a mesma polarização. Esse fato sugere a importância das citocinas produzidas por essas células na regulação de suas funções. A influência da IL-10, IL-12, IL-18, IFN- α e IFN- γ na regulação autócrina de macrófagos tem sido descrita, demonstrando que os macrófagos não apenas obedecem às ordens dos linfócitos T, como podem até mesmo comandar o tipo de resposta dessas células. Adicionalmente, através das citocinas produzidas por eles, são aptos a se auto-regularem (Di Marzo *et al.* 1994, Fantuzzi *et al.* 2000, Mills *et al.* 2000, Xing, Zganiacz & Santosuosso 2000, Bastos *et al.* 2002, Mantovani, Sica & Locati 2005).

As citocinas constituem um grupo de proteínas de baixo peso molecular, geralmente glicosiladas, secretadas por diferentes células do sistema imune, como linfócitos, monócitos e macrófagos. Suas ações são geralmente pleiotrópicas, podendo atuar de forma autócrina, parácrina e endócrina, na mediação de diferentes efeitos biológicos (Abbas & Lichtman 2005a). Dentre as citocinas utilizadas para a avaliação de protótipos vacinais na ativação de APCs, podemos destacar TNF- α , IL-10 e IL-12 (Henriques & Sampaio 2002, Abbas & Lichtman 2005a). A IL-10 é uma citocina reguladora secretada por macrófagos ativados e por algumas células Th. Tem ação anti-inflamatória, agindo na inibição de macrófagos e células dendríticas ativados, inibindo a ação de IL-12, TNF- α e IFN- γ , com efeitos associados ao término das reações da CMI (Standiford 2000, Atkinson *et al.* 2000, Abbas & Lichtman 2005a). A IL-12 é a principal citocina mediadora da resposta imune inata a patógenos intracelulares, dentre os quais as micobactérias, sendo um importante indutor de CMI. Atua na ativação de células T citotóxicas e células NK induzindo a

produção de INF- γ , o qual ativa os macrófagos infectados e na diferenciação das células Th1, possuindo um importante papel na interação entre a imunidade inata e adaptativa (Atkinson *et al.* 2000, Abbas & Lichtman 2005a). O TNF- α é uma das principais citocinas mediadoras da resposta pró-inflamatória produzida principalmente por fagócitos mononucleares ativados além de células T, células NK e mastócitos. Atua principalmente no recrutamento de neutrófilos e monócitos para os sítios de infecção, na indução de macrófagos e células endoteliais para secreção de quimiocinas e na indução de apoptose em algumas células (Atkinson *et al.* 2000, Standiford 2000, Abbas & Lichtman 2005a).

Os monócitos e macrófagos possuem um papel crucial na apresentação de antígenos estranhos a outras células do sistema imune e na produção de sinais que direcionam o padrão da resposta imune necessária para cada tipo de patógeno. Dentre os sinais podemos destacar as citocinas, que são proteínas imunomoduladoras que ajudam a direcionar a resposta imune em diversos processos inflamatórios incluindo processos infecciosos (Xing, Zganiacz & Santosuosso 2000, Berges *et al.* 2005). Por essas características, os macrófagos vêm sendo utilizados para avaliar o perfil imunogênico de diferentes antígenos candidatos à vacina (Campbell, Mann & Chadee 2000, Misumi *et al.* 2003, Ciabattini *et al.* 2006). Adicionalmente, é importante considerar que entre os principais requerimentos para o sucesso da vacinação está a ativação das APCs, que envolve o processamento de antígenos, a expressão de fatores co-estimulatórios, e a secreção de citocinas, que é essencial para o início da resposta imune (Ada 2004).

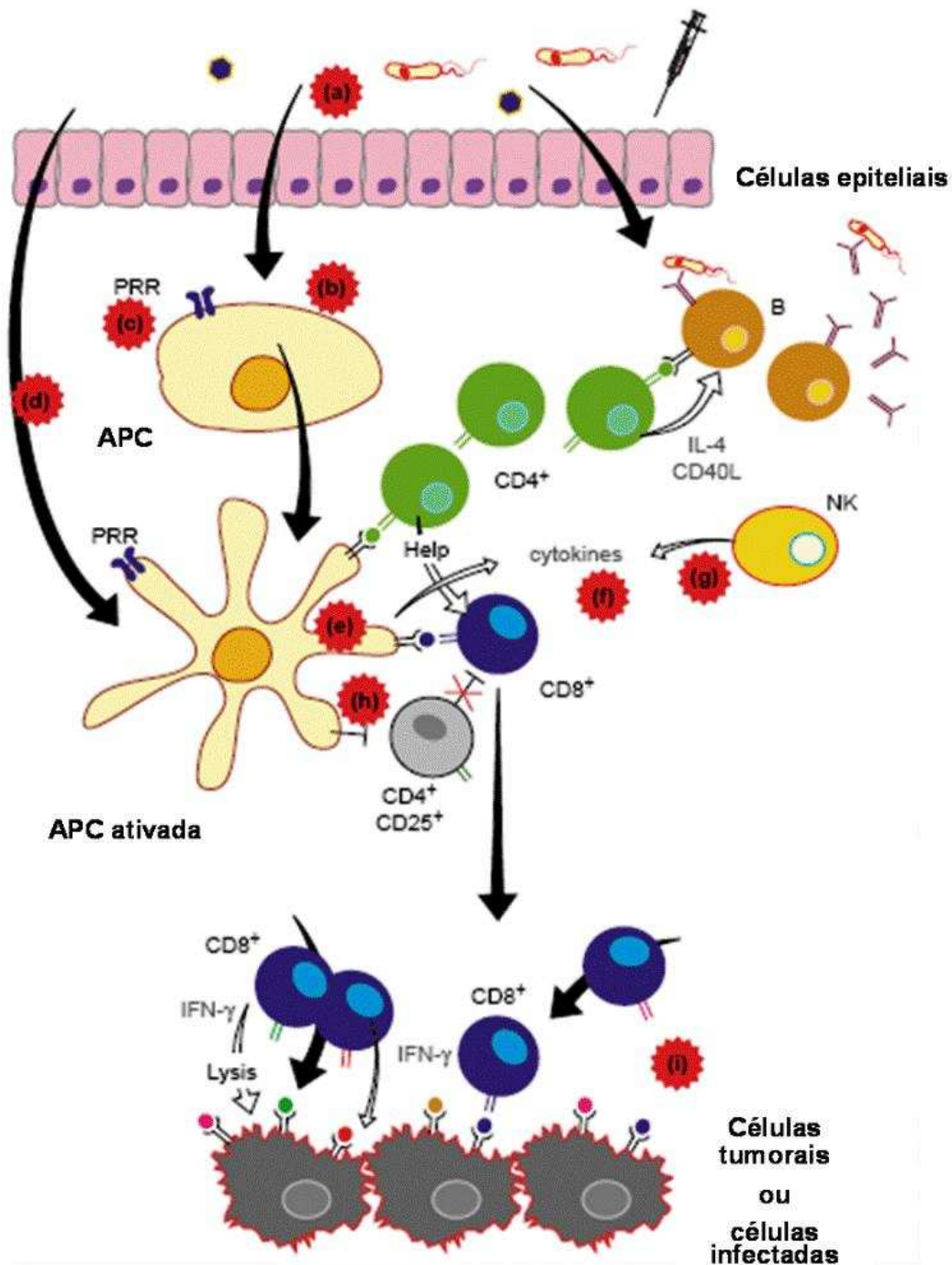


Figura 1.1: Visão esquemática da indução do sistema imune gerada por um patógeno ou uma vacina (Adaptado de Wack & Rappuoli 2005). As letras de (a) a (i) indicam situações onde o melhoramento de vacinas pode levar a respostas imunes mais eficientes. (a) A via de inoculação pode influir no tipo de resposta imune e reduzir o número de doses. (b) O antígeno particulado é reconhecido mais facilmente por APCs em relação ao antígeno solúvel. (c) Aumento da ativação de APCs através do reconhecimento de imunoestimulantes pelas PRRs. (d) A maturação e o carreamento de antígenos *in vitro* pelas APCs são candidatos vacinais promissores. (e) A vacinação de DNA leva a uma maior eficiência na apresentação de antígenos pelas moléculas de MHC de classe I. (f) O uso de citocinas como adjuvante natural de vacinas. (g) O recrutamento de células NK pode ser relacionado à produção inicial de citocinas do tipo Th1. (h) As vacinas podem atuar no efeito regulatório das células Treg CD4 CD25 visando a quebra da tolerância imunológica. (i) A pré-existência de células T específicas para antígenos expressos por células tumorais não contidos na vacina expande-se após a vacinação, predominando na resposta anti-tumor.

O advento da cultura celular no início do século passado surgiu como um método para estudar o comportamento de células dos animais sem as variações sistêmicas que poderiam surgir no animal tanto durante a homeostase, como durante um estado de estresse de um experimento (Harrison 1910, Carrel 1912 *apud* Freshney 2000b). As culturas de células vêm sendo utilizadas extensivamente para o desenvolvimento e a produção de uma variedade de produtos terapêuticos e profiláticos incluindo hormônios, citocinas, enzimas, antibióticos e vacinas tornando-se, por essa razão, uma ferramenta indispensável para geneticistas, imunologistas, vacinologistas e, especialmente, para a indústria farmacêutica (Freshney 2000a, FDA 2006).

Em 1991, Auwerx comparou diferentes linhagens de células mielóides de origem humana (HL-60, U-937, KG-1, HEL e THP-1) e concluiu que as células THP-1, após o tratamento com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), podem servir de modelo para o estudo *in vitro* dos mecanismos de regulação gênica, funções fisiológicas e diferenciação monócito/macrófago, assim como podem ser utilizadas no estudo dos vários aspectos biológicos do macrófago como o seu papel nos mecanismos de defesa e como célula secretora (Stokes & Doxsee 1999, Medeiros, 2001, Oliveira, Charlab & Pessolani, 2001, Ritelli *et al.* 2003, Theus, Cave & Einsenach, 2004, Berges *et al.* 2005, Zhao *et al.* 2005, Amadori *et al.* 2006).

A célula THP-1 é um monócito obtido a partir do sangue de uma criança com leucemia aguda (Tsuchiya *et al.* 1980, ATCC 2006). Na sua caracterização foi descrito que essas células apresentam capacidade fagocítica, expressão de lisozima e teste negativo para o vírus Epstein-Barr (Tsuchiya *et al.* 1980). Além disso, não possuem atividade citolítica dependente de anticorpo e sua diferenciação pode ser induzida por compostos do tipo ésteres de forbol como, por exemplo, 12-O-tetradecanolforbol-13-acetato (TPA) ou PMA (Tsuchiya *et al.* 1980, Stokes & Doxsee 1999, ATCC 2006).

Theus, Cave & Einsenach (2004) destacaram que as vantagens do uso da linhagem celular THP-1 como modelo de diferenciação monócito/macrófago *in vitro* são a invariabilidade da sua função de macrófago e a reprodutibilidade do crescimento celular o que permite seu estudo em diferentes estágios (normal *versus* ativado). Além disso, foi demonstrado que a diferenciação da THP-1 pode ser utilizada como modelo experimental para maturação de células dendríticas humanas

(Berges *et al* 2005) e como modelo para a avaliação da resposta inflamatória a diferentes ácidos graxos poliinsaturados (Zhao *et al.* 2005).

Stokes e Doxsee (1999) demonstraram que as células THP-1 podem ser utilizadas como modelo para investigar as interações micobacterianas em macrófagos e Medeiros (2001) utilizou-as como substrato para a avaliação da estabilidade estrutural e funcional de cepas de *Mycobacterium bovis* bacilo Calmette-Guérin (BCG) recombinante (BCGr) expressando antígeno de *Bordetella pertussis*. Oliveira, Charlab & Pessolani (2001) compararam o nível de expressão de TNF- α em células THP-1 infectadas com BCG e *Mycobacterium leprae* e, posteriormente, o uso das células THP-1 foi proposto para o desenvolvimento de uma alternativa rápida para a detecção de *M. bovis* no diagnóstico de tuberculose bovina (Ritelli *et al.* 2003, Amadori *et al.* 2006), e como modelo para avaliação da virulência e da persistência intracelular de micobactérias modificadas geneticamente (Lewis *et al.* 2003).

O Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) vem trabalhando desde 1995, com o apoio dos programas PAPES (Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde) e PDTIS (Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e de Bio-Manguinhos, na tecnologia para modificação genética da vacina BCG com o objetivo de desenvolvimento de vacinas vetorizadas contra agentes infecciosos e parasitários. Nesse processo vários cepas de BCG recombinante (BCGr) foram construídas visando a expressão de antígenos protetores de diversos patógenos como *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, o vírus da Hepatite B, entre outros (Medeiros 2001, Santos 2002, Rezende *et al.* 2005, Medeiros *et al.* 2005). Como parte desse mesmo projeto Argondizzo desenvolveu, em 2005, diferentes protótipos vacinais de BCGr expressando a proteína Sm14 de *Schistosoma mansoni* (Figura 1.2) como possíveis alternativas vacinais para a imunoprofilaxia da esquistossomose.

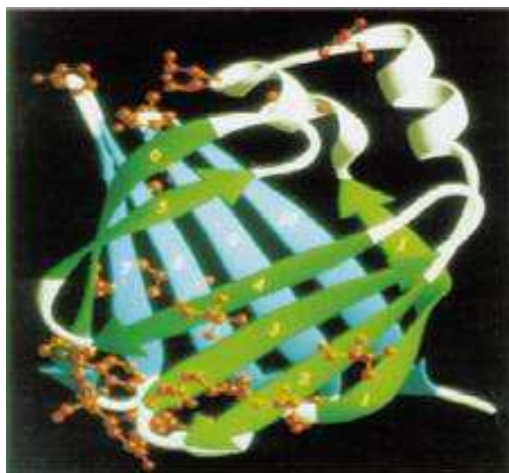


Figura 1.2: Diagrama do modelo molecular da proteína Sm14 (Adaptado de Tendler *et al* 1996)

A esquistossomose é um problema mundial. Estima-se atualmente que pelo menos 200 milhões de pessoas estejam infectados pelo *Schistosoma mansoni* e que mais de 600 milhões de indivíduos estejam em risco no Brasil e no mundo (Argondizzo 2005, Varaldo *et al.* 2006). Dentre as razões para a obtenção de uma vacina efetiva contra o *Schistosoma mansoni* está a elevada frequência da doença na população de muitas regiões, principalmente em países em desenvolvimento, podendo levar os pacientes com a forma hepatoesplênica a um padecimento crônico grave e mortal, sendo assim um grande desafio para a Saúde Pública (WHO 2000). No entanto, a Organização Mundial da Saúde (WHO) através de seu Programa Especial para Treinamento e Pesquisa (TDR), identificou seis antígenos como candidatos para o desenvolvimento de uma vacina. Dentre esses antígenos destaca-se a proteína Sm14, que é uma proteína ligante a ácidos graxos (FABP), de 14 kDa presente no esquistossômulo adulto (Chitsulo *et al.* 2000, WHO 2000, Al-Sherbiny *et al.* 2003).

Na busca de uma vacina candidata contra a esquistossomose, a estratégia de utilização da vacina BCG como vetor para a expressão de antígenos de *S. mansoni* *in vivo* é provavelmente uma das iniciativas mais importantes e de melhor relação custo - benefício no momento para o controle da esquistossomose em países sub-desenvolvidos ou em desenvolvimento (Kremer *et al.* 1998, Dai *et al.* 2003, Varaldo *et al.* 2004, Argondizzo 2005, Varaldo *et al.* 2006). Isso ocorre porque o BCG apresenta um elenco de vantagens de difícil superação entre os vetores vivos atenuados disponíveis no momento, tais como o fato de já ter sido administrado a

bilhões de pessoas no mundo inteiro com baixo índice de efeitos colaterais, poder ser administrado em qualquer época após o nascimento, não ser afetado pelos anticorpos maternos, apresentar baixo custo de produção e ser uma das vacinas mais termoestáveis que se conhece (Smith & Starke 2004, Bonah 2005, SLIPE & API 2005, WHO 2006). Além disso, possui baixo custo de produção, é estável do ponto de vista da atenuação, é controlável por antibióticos, apresenta tropismo por células responsáveis pela montagem da resposta imune (células dendríticas, macrófagos e células linfóides) e é capaz de induzir uma resposta imune celular e humoral contra bactérias, vírus, parasitas e toxinas (Ohara & Yamada 2001, Smith & Starke 2004, SLIPE & API 2005, WHO 2006). Essas características fazem do BCG um dos mais promissores vetores vivos atenuados para uma plataforma vacinal visando a liberação de antígenos heterólogos protetores *in vivo* (Medeiros 2001, Ohara & Yamada 2001, Santos 2002, Smith *et al.* 2001, Argondizzo 2005, Varaldo *et al.* 2004, Varaldo *et al.* 2006).

A capacidade do *M. bovis* BCG sub-cepa Pasteur transformado com plasmídeo pPL73 expressando a proteína Sm14 de *S. mansoni* (BCGr/pPL73-sm14) de induzir efeito protetor semelhante ou maior do que a proteção induzida por três doses da mesma proteína produzida e purificada a partir de *Escherichia coli*, foi avaliada na Fundação Oswaldo Cruz utilizando modelo murino para estudos de proteção, via intraperitoneal, com uma ou duas doses do BCGr/pPL73-sm14, em combinação ou não, com uma dose de reforço da proteína recombinante Sm14 purificada. Nessas condições demonstrou-se que o BCGr/pPL73-sm14 em dose única foi capaz de induzir aproximadamente 50% de proteção. No entanto, apesar dos camundongos vacinados com BCGr/pPL73-sm14 via intraperitoneal não apresentarem anticorpos anti-Sm14, esplenócitos desses animais liberaram IFN- γ quando estimulados com a proteína recombinante Sm14r, sendo assim capaz de induzir níveis de proteção similares àqueles induzidos pela proteína Sm14r, com a vantagem do BCGr/pPL73-sm14 ser administrado em dose única (Varaldo *et al.* 2004).

Apesar da existência na FIOCRUZ de modelo murino de proteção padronizado e aprovado internacionalmente para a avaliação de protótipos vacinais contra a esquistossomose, o grande desafio do projeto para uma nova vacina, com o protótipo BCG/sm14, é a demonstração de proteção em modelo humano. Por essa razão, objetivamos nesse trabalho o desenvolvimento de um protocolo visando o uso de células humanas na avaliação e seleção de vacinas candidatas contra a

esquistossomose. Com essa finalidade, utilizamos como substrato monócitos humanos derivados da linhagem THP-1 para avaliação e quantificação da expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α verificadas após a infecção das células THP-1 com o protótipo vacinal BCG/*sm14*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Demonstrar a viabilidade de um sistema de avaliação *in vitro* para protótipos vacinais baseado no perfil de citocinas expressas pela linhagem celular de monócitos humanos THP-1.

2.2 Objetivos Específicos

- Criar um protocolo de infecção com o *Mycobacterium bovis* BCG em células THP-1
- Avaliar a estabilidade funcional, o grau de infecciosidade e a persistência intracelular do protótipo vacinal BCG/*sm14* em células THP-1
- Avaliar a capacidade do protótipo vacina BCG/*sm14* de induzir a diferenciação e maturação de células THP-1
- Avaliar, quantificar e comparar a expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α após infecção com protótipo vacinal BCG/*sm14* e com os BCGs controles (BCG Pasteur e construção BCG/pAU5) em células THP-1

3. METODOLOGIA

3.1 Cultivo da célula THP-1

A linhagem celular THP-1 (ATCC nº. TIB 202) foi obtida do acervo do Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) de Bio-Manguinhos, Fiocruz mantidos em nitrogênio líquido (-196°C) por no máximo de 12 meses. As células foram descongeladas de criotubos Posteriormente, foram realizadas três lavagens com PBS [137mM de NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 2.7mM KCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 10mM Na₂HPO₄ (Merck) e 1.8mM KH₂PO₄ (Merck)] 1X pH 7.4. Para a manutenção celular foram testados, diversos meios de cultura (MEM, D-MEM e RPMI 1640) e suplementos [soro fetal bovino inativado – SFB (Gibco Life Technology / Invitrogen, Grand Island, EUA), HEPES (Gibco), L-glutamina Sigma-Aldrich), NaHCO₃ (Merck), 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), piruvato de sódio (Sigma-Aldrich), estreptomicina/penicilina (Gibco), gentamicina (Gibco)]. Após observação morfológica das células por microscopia óptica (400 x), definiu-se que para os experimentos propostos seria utilizado o meio de cultura foram cultivadas inicialmente em meio RPMI 1640 (Gibco) formulado com 0,2% (v/v) de NaHCO₃ (Sigma-Aldrich), suplementado com 20% (v/v) de SFB e mantidas em garrafas T de 25 cm² (Corning, Corning, EUA) a 37°C em atmosfera com 5% de gás carbônico (CO₂) por 3 dias.

Quando da necessidade de se ampliar o acervo desta linhagem, as células foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos, lavadas duas vezes em PBS e ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB. A concentração e viabilidade celular foram determinadas em hemocítmetro por microscopia óptica (100 x) utilizando-se a diluição de 1:50 em azul de tripan 0,4% (Gibco). Para a criação dos lotes de trabalho, após as etapas de centrifugação e lavagem, as células foram ressuspensas na concentração de 1 x 10⁷ células/mL em solução de criopreservação [90% SFB e 10% dimetil sulfoxido (DMSO - Sigma-Aldrich)] e mantidas em nitrogênio líquido a – 196°C.

No preparo das células para a realização dos experimentos, as células foram removidas do meio de cultura original, lavadas duas vezes em PBS, ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB. Após a quantificação as células foram ressuspensas na concentração de 1 x 10⁶ células/mL em RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB.

3.2. Cultivo das cepas de BCG

Para a presente proposta foi utilizado o protótipo vacinal *M. bovis* BCG sub-cepça Pasteur 1173P2 transformada com o vetor plasmidial pAU5 contendo o gene *sm14* de *S. mansoni* (BCG/*sm14*). Como controle dos experimentos, foram utilizados a amostra vacinal *M. bovis* BCG sub-cepça Pasteur 1173P2 (BCG-P), assim como o *M. bovis* BCG sub-cepça Pasteur transformado o plasmídeo pAU5 (BCG/pAU5). Os BCGs recombinantes foram desenvolvidos no LATER pelos pesquisadores Dr. Douglas MacIntosh e Msc. Ana Paula C. Argondizzo (Argondizzo 2005) (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Características das cepas de BCG

Cepas	Características
BCG-P	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepça Pasteur 1173P2
BCG/pAU5	<i>M. bovis</i> BCG sup-cepça Pasteur Vetor pAU5: <i>kanR</i> , <i>oriE</i> , <i>oriM</i> , <i>Phsp60</i> *
BCG/ <i>sm14</i>	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepça Pasteur Vetor pAU5/ <i>sm14</i> : <i>kanR</i> , <i>oriE</i> , <i>oriM</i> , <i>Phsp60</i> *, <i>sm14</i>

pAU5 - vetor de expressão citoplasmático

kanR - gene de resistência à canamicina derivado do Tn903

oriE - origem de replicação do bacteriófago T4 de *Escherichia coli*

oriM - origem de replicação do plasmídeo pAL5000 de *Mycobacterium fortuitum*

*Phsp60** - promotor *hsp60* de *Mycobacterium bovis* BCG modificado

sm14: gene de *Schistosoma mansoni*

Os BCGs foram estocados em alíquotas e armazenados a -70°C. No momento do uso as alíquotas foram descongeladas e cultivadas em 20 mL de caldo Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA) suplementado com 10% (v/v) da solução Albumina – Dextrose – Catalase (ADC - Difco), 0,05% (v/v) de Tween 80 (Merck) e 0,2% (v/v) de glicerol (Sigma-Aldrich) a 37⁰ C e 5% CO₂ por 10 dias, quando atingem a fase exponencial de crescimento.

Para o preparo dos inóculos, o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG e BCG-pAU5) foram obtidos a partir de culturas em fase exponencial. Os BCGs foram

centrifugados a 1950 x g e lavados duas vezes em PBS. Após a lavagem, a concentração de cada amostra de BCG foi ajustada com PBS para o padrão 1 da escala de MacFarland (MacFarland, 1907), ou seja, $3,0 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro. Uma alíquota de 10 μ L desta suspensão bacteriana foi quantificada em hemocitômetro por microscopia ótica (100x), para confirmação da leitura por turbidez.

Devido à dificuldade para a determinação da viabilidade dos BCGs em UFC utilizando o meio Middlebrook 7H10 (Difco) suplementado com 10% (v/v) de ADC preparado no laboratório, buscaram-se diferentes alternativas, como a substituição do lote do meio Middlebrook 7H10, utilização do meio Middlebrook 7H11 e suplementação dos meios com ADC e OADC comercial (Difco).

Em cada experimento, o número de bactérias viáveis foi determinado através de plaqueamento de diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) em triplicata, em meio ágar Middlebrook 7H11 (Difco) suplementado com 10% (v/v) da solução de Ácido oléico - Albumina - Dextrose - Catalase (OADC – Difco) e 0,2% (v/v) de glicerol. As placas foram incubadas por quatro semanas em estufa a 37°C em 5% CO₂.

3.3 Avaliação da expressão da proteína recombinante Sm14 em BCG/sm14

Para a confirmação da expressão da Sm14 pela cepa BCG/sm14 foi utilizado a técnica de *western blotting* com base no protocolo descrito por Argondizzo (2005). Amostras de 4 mL das culturas bacterianas foram centrifugadas por 5 minutos a 6500 x g a temperatura ambiente sendo o precipitado rompido por lise mecânica utilizando-se 0,5 g de pérolas de vidro de 0,5 mm de diâmetro (BioSpec Products – Bartlesville, EUA), 60 μ L de tampão Tris-HCl 1 mM 50 mM pH 6.8 e 20 μ L de tampão de amostra 4X (Tris-HCl 50mM pH 6,8, DTT 100mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%). As amostras foram agitadas inicialmente por 45 segundos sendo colocadas em gelo por um minuto e posteriormente agitadas por 30 segundos, utilizando-se o aparato “Mini Beadbeater” (Biospec Products, Bartlesville, Canada). Em seguida, as amostras foram fervidas por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida 13,5% [técnica de SDS-PAGE (Laemmli 1970)] com espaçador de 1 mm. A corrida foi realizada a 100 volts, no gelo. O material do gel foi transferido para membrana de duralose (Duralose – UV™ Membranes – Stratagene, La Jolla, CA, EUA), sendo a transferência realizada por 90 minutos a 90 volts, no gelo.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada em solução de 3% (p/v) de albumina bovina (BSA - Sigma-Aldrich) em PBS pH 7.4 com 0,02% (v/v) de Tween 20 (PBS-T) por um período de 2 horas a temperatura ambiente e sob leve agitação. A seguir a membrana foi incubada com o anticorpo primário policlonal anti-Sm14 (produzido em coelhos New Zealand no Laboratório de Esquistossomose Experimental, Departamento de Helminologia, IOC, FIOCRUZ), diluído 1:500 ou 1:1000. A membrana foi incubada com o anticorpo primário a temperatura ambiente por um período de 16 a 18 horas (*overnight*), a seguir a membrana foi lavada duas vezes com PBS-T por cerca de 40 minutos e duas vezes com PBS pelo mesmo tempo. O anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich), foi diluído na razão 1:30.000 em PBS-T e a membrana incubada por 2 horas sob agitação leve a temperatura ambiente. A seguir procederam-se novamente as lavagens como descrito anteriormente. Após as lavagens, a membrana foi revelada com 5 mL da solução “Western Blue^R Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase” (Promega, Madison, EUA).

3.4 Padronização da multiplicidade de infecção (MOI) do BCG-P

No intuito de verificar a produção de citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α por células THP-1 induzidas por diferentes inóculos de BCG-P, as células foram infectadas numa relação de 5, 10 ou 50 UFC de BCG para cada célula THP-1. Para este ensaio foram definidos apenas dois tempos de infecção: 4 e 24 horas. Foram incubadas 1×10^6 células THP-1 com 5×10^6 , 1×10^7 ou 5×10^7 de BCG-P, em triplicata, mantidos em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB em tubos cônicos de 1,5 mL e incubadas por 4 horas, sob agitação (120 rpm) a 37°C em ambiente com 5% CO₂.

Após este período, as amostras foram centrifugadas a 400 x g e lavadas três vezes com PBS. Após a lavagem, as amostras referentes a avaliação de 4 horas de infecção foram homogeneizadas com 1 mL de meio RPMI 1640, sendo retirados 100 μ L para a recuperação dos BCGs intracelulares, e 900 μ L para avaliação da expressão de citocinas secretadas por células THP-1 infectadas com BCG pela técnica de citometria de fluxo. Já as amostras de 24 horas de infecção, foram homogeneizadas com 1 mL de meio RPMI 1640 com 10% (v/v) de SFB e incubados, sob agitação (120 rpm) a 37°C em ambiente com 5% CO₂ até o término do tempo

proposto (24 horas) sendo posteriormente processadas da mesma forma que as amostras de 4 horas.

Para o acompanhamento da viabilidade dos BCGs intracelulares, nos 100 μ L retirados das amostras, foram adicionados 900 μ L de tampão PBS com 0,1% (v/v) de Tween 80 (Pro Analysis, Rio de Janeiro) e centrifugados por 10 minutos a 6500 x g, para lisar as células THP-1 e obter os BCGs antes internalizados. O precipitado então foi diluído em 100 μ L de meio Middlebrook 7H9 e plaqueado em meio Middlebrook 7H11 para determinação de UFC, como descrito no item 3.2.

3.5 Infecção do BCG/*sm14* e BCGs controles em células THP-1

Os experimentos envolvendo a produção de citocinas em células THP-1 infectadas com BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/ ρ AU5) foram realizados como descrito no item 3.4, utilizando MOI de 10 micobactérias para 1 célula THP-1 nos tempos de 4, 24 e 48 horas pós-infecção. Para a análise do perfil de citocinas expressas pela célula THP-1 infectada com as diferentes amostras de BCG utilizaram-se as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo.

3.6 Avaliação da capacidade de proliferação celular da célula THP-1

Para avaliar a capacidade de replicação e a viabilidade celular das células THP-1 infectadas com BCG/*sm14* e os BCGs controles, um cultivo celular foi estabelecido por um período de 24 e 48 horas após a infecção. As células THP-1 foram infectadas com MOI de 10 micobactérias para 1 célula THP-1 como descrito no item 3.3. As amostras contendo $2,5 \times 10^5$ células THP-1 infectadas ou não com os BCGs, foram suspensas em 100 μ L de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB por poço em placas de 96 poços. Dezesesseis horas antes do término do tempo de infecção, foi adicionado 1 μ Ci de timidina tritiada (Timidina-H³ - Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA) por poço e as placas foram mantidas em estufa a 37°C em ambiente com 5% CO₂. Ao término dos tempos de infecção (24h e 48h) as placas foram congeladas a -20°C até a realização da leitura.

No dia de leitura, as placas foram descongeladas a temperatura ambiente e as amostras foram transferidas através do coletor de células (Cell Harvester - Skation Instruments AS, Lier, Noruega) para o papel de filtro (FilterMAT - Skation Instruments AS). As amostras no papel de filtro foram colocadas em tubos de

cintilação sendo adicionado 1 mL por tubo de solução de cintilação [Difeniloxazol (PPO - Merck), Bis-feniloxasolilbenzeno (POPOP - Merck), Tolueno (Merck)]. As amostras foram contadas em espectrômetro de cintilação líquida (TRI-CARB® 1600 CA, Packard, Milano, Itália) e o resultado expresso em contagem por minuto (cpm).

3.7 Avaliação da estabilidade funcional (expressão do gene *kanR*) do vetor de expressão pAU5 dos BCGr

A confirmação das cepas recombinantes de BCG transformadas com os plasmídeos pAU5 e pAU5-*sm14* foi determinada através do plaqueamento de diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}), em triplicata, dos inóculos utilizados para infecção e dos BCGs recuperados das células THP-1 nos diferentes tempos de infecção (descrito no item 3.4), em meio ágar Middlebrook 7H11 suplementado com 10% (v/v) de OADC e 0,2% (v/v) de glicerol, adicionado ou não de 25 µg/mL de canamicina (Kan - Sigma-Aldrich), para a avaliação da expressão do gene *kanR* contido no vetor de expressão pAU5. As placas foram incubadas por quatro semanas para determinação de UFC em estufa a 37°C em ambiente com 5% CO₂.

3.8 Protocolo de imunocitoquímica para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1

As amostras das células THP-1 infectadas com o BCG/*sm14* e os BCGs controles foram removidas 4, 24 e 48 h após a infecção, centrifugadas a 400 x g, lavadas três vezes com PBS e mantidas em 1mL de PBS.

Utilizando uma centrífuga citológica (Citospin modelo 2400 – Fanem, São Paulo), as células foram transferidas para lâminas de microscopia (Solidor – Médico International Trading Co, Tianjin, China) previamente tratadas com 2 % (v/v) de silano (Sigma-Aldrich) em acetona PA (Merck). De cada amostra, foram adicionados 150 µL em cada orifício seguido de centrifugação a 1800 rpm por 3 minutos.

As células foram fixadas com 4% de paraformaldeído pH 7,4 (Sigma-Aldrich), por 15 minutos, e lavadas em tampão Tris base salina (TBS) com 0,2% (v/v) de Tween20 (Merck), pH 7,4 10 mM (TBS-T) por 10 minutos. A seguir, foram adicionados 50 µL de SFB diluído em TBS-T (1:100) por 30 minutos, com o objetivo de impedir ligações inespecíficas. Após a remoção do soro, foram adicionados 50 µL

dos anticorpos monoclonais primários (Tabela 3.2) diluídos em TBS-T. As lâminas foram incubadas em câmara úmida *overnight* a 4°C.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com TBS-T (3 banhos por 5 minutos cada) e incubadas com 50 µL de anticorpo secundário biotilado (Tabela 3.1). Após 30 minutos, as lâminas foram lavadas com TBS-T em três banhos por 5 minutos cada e foram adicionados 50 µL do complexo estreptoavidina-peroxidase (Dako, Glostrup, Dinamarca) por 30 minutos em câmara úmida, lavando-se em seguida três vezes por 5 minutos cada com TBS-T. Para a revelação, foram adicionados 50 µL em cada amostra da solução de 3-3' diaminobenzidina (DAB - Dako) sendo acompanhada a conversão da tonalidade em microscópio óptico (400 x). A reação foi finalizada mergulhando as lâminas em água destilada e, posteriormente, em água corrente. A seguir, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer (Dako) por 2 minutos, e posteriormente lavadas em água corrente. Logo após, as lâminas foram desidratadas em etanol (Merck) por 10 minutos, diafanizadas em xilol (Merck) por 10 minutos e montadas em “Faramount Mounting Medium, Aqueous” (Dako) entre lamínulas (Corning).

O percentual de células, expressando as citocinas IL-10, IL-12 e TNF-α após infecção com BCG/*sm14*, BCG-P ou BCG/pAU5 por 4, 24 e 48 horas foi determinado pela contagem de células positivas em um campo de duzentas células, utilizando microscopia óptica (1000x).

Tabela 3.2: Anticorpos utilizados no protocolo de imunocitoquímica

Anticorpo Primário	Origem	Diluição	Empresa	Anticorpo Secundário
anti-IL-10 humana	Rato	1:75	Mabtech AB Nacka Strand, Suécia	Coelho anti-rato (Dako)
anti-IL-12 (p70) humana	Camundongo	1:200	Mabtech AB Nacka Strand, Suécia	Kit LSAB – anti-camundongo, anti-coelho e anti-cabra (Dako)
anti-TNF-α humana	Cabra	1:25	R&D Systems Minneapolis, USA.	Kit LSAB – anti-camundongo, anti-coelho e anti-cabra (Dako)

3.9 Protocolo de citometria de fluxo para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1

Os experimentos envolvendo a produção de citocinas em células THP-1 mediada pela infecção com BCG/*sm14* e os BCGs controles foram realizados como descrito no item 3.5. Nas amostras onde a infecção ocorreu por 24 horas e 48 horas foram adicionadas 1 μ L de brefeldina A (BD Biosciences / Becton Dickinson & Company, San Diego, EUA) 4 horas antes do término de cada tempo de infecção, atuando na inibição do complexo de Golgi por este ser o principal centro de distribuição da célula, visando o acúmulo de citocina no interior da célula.

As amostras foram ressuspensas em 50 μ L da solução *Cytofix/Cytoperm* (BD Biosciences), homogeneizadas no agitador de tubos (Fanem) e incubadas por 20 minutos em gelo. Em seguida foram adicionados 150 μ L de PBS, as amostras foram centrifugadas por 10 segundos a 6500 x *g* e ressuspensas em 200 μ L tampão *Perm/Wash* 1X (BD Biosciences) adicionado com 10% (v/v) de soro AB humano (Sigma-Aldrich). Os anticorpos (Tabela 3.2) diluídos no tampão *Perm/Wash* adicionado com 10% (v/v) de soro AB humano foram adicionados as amostras e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram lavadas uma vez com 400 μ L de *Perm/Wash* e uma vez com 400 μ L PBS.

A leitura das amostras foi realizada no citômetro Coulter EPICS XL-MCL (Beckman Coulter, Fullerton, EUA), utilizando o filtro *Band Pass* (BP) de 525 nm para a leitura dos anticorpos marcados com fluorocromo Ficoeritrina (PE) e o filtro BP de 575 nm para leitura do anticorpo marcado com fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Tabela 3.3) e analisadas no programa WinMDI versão 2.8. A seleção da região de interesse (R1) foi realizada em gráficos de distribuição em pontos de tamanho celular relativo (*Foward angle light scatter* - FSC) versus granulosidade celular (*Side angle light scatter* - SSC), de onde foram excluídos tanto restos como grumos celulares, sendo analisado um mínimo de 20 mil eventos por amostra.

Tabela 3.3: Anticorpos utilizados no protocolo de citometria de fluxo

Anticorpo Primário	Origem	Diluição	Empresa	Fluorocromo	Filtros (Band Pass)
anti-IL-10 humana	Rato	1:200	BD Biosciences	PE	575 nm
anti-IL-12 (p70) humana	Camundongo	1:200	BD Biosciences	PE	575 nm
anti-TNF- α humana	Camundongo	1:800	BD Biosciences	FITC	525 nm

4. RESULTADOS

4.1 Cultivo da célula THP-1

Para a padronização da manipulação da célula THP-1 foram determinados parâmetros para o meio de cultivo e manutenção.

4.1.1 Meios de cultivo.

Foram testados, diversos meios de cultura (MEM, D-MEM e RPMI 1640) e suplementos (SFB, HEPES, L-glutamina, NaHCO_3 , 2-mercaptoetanol, piruvato de sódio, estreptomicina/penicilina, gentamicina) e após observação morfológica das células por microscopia óptica (400 x), definiu-se que para os experimentos propostos seria utilizado o meio de cultura RPMI preparado com 0,2% (v/v) de NaHCO_3 , sendo suplementado com SFB nas concentrações de 20% para o descongelamento e 10% para a manutenção e experimentos. O uso de outros suplementos de crescimento como piruvato de sódio e 2-mercaptoetanol não se mostraram necessários (dados não mostrados).

4.1.2 Manutenção

A manutenção da célula THP-1 foi realizada a cada 3-4 dias, contudo, foi estipulado após observação morfológica, que os experimentos seriam realizados com células que estivessem na terceira ou quarta passagem (Figura 4.1). Da mesma forma, para a criação dos lotes de trabalho e reposição do acervo, as células THP-1 seriam mantidas até a oitava passagem.

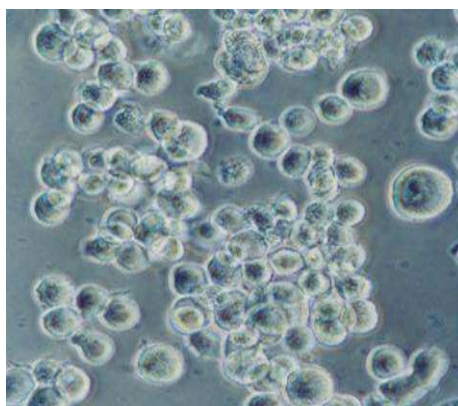


Figura 4.1 Microscopia óptica (200 x) de células THP-1, após três passagens, mantidas em meio RPMI 1640 preparado com 0,2% de NaHCO_3 e suplementado com 10% de SFB.

4.2. Cultivo das cepas de BCG

Para o cultivo das cepas BCG-P, BCG/pAU5 e BCG/sm14 foi utilizado a metodologia usualmente aplicada no LATER (Medeiros 2001, Santos 2002, Argondizzo 2005). Entretanto devido à dificuldade para a determinação da viabilidade dos BCGs em UFC utilizando o meio Middlebrook 7H10 (Difco) suplementado com 10% (v/v) de ADC preparado no laboratório, buscaram-se diferentes alternativas, como a substituição do lote do meio Middlebrook 7H10, utilização do meio Middlebrook 7H11 e suplementação dos meios com ADC e OADC comercial (Difco).

A quantificação dos BCGs obtida, em UFC, após o plaqueamento em diferentes formulações dos meios Middlebrook 7H10 e 7H11, foi confrontada com a quantificação das amostras em hemocitômetro e no ajuste ao padrão 1 do sistema de McFarland. Os resultados demonstraram que os BCGs cultivados em meio Middlebrook 7H11 preparado com 0,2% de glicerol e suplementado com 10% de OADC (Figura 4.2) obtiveram a mesma quantidade de UFC que as amostras ajustadas ao padrão 1 do sistema de McFarland e quantificadas em hemocitômetro.

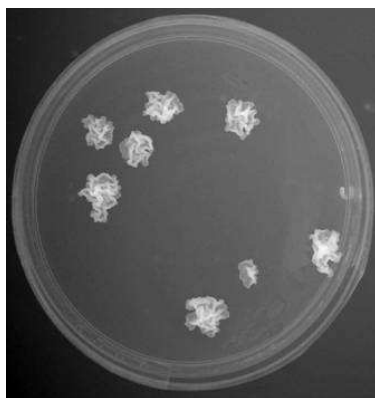


Figura 4.2 Cultura de *M. bovis* BCG Pasteur em meio 7H11 suplementado com 10% de OADC.

4.3 Expressão da proteína Sm14 pelo BCG/*sm14*

A técnica de *Western blot* foi empregada para avaliar a expressão da proteína Sm14 pelos quatro clones da construção BCG/*sm14* utilizados nos experimentos de infecção em células THP-1.

Foi utilizada como padrão (P), 20 ng da proteína Sm14r produzida em *E.coli*, gentilmente cedida pela Dr^a. Miriam Tendler (Laboratório de Esquistossomose Experimental – IOC/Fiocruz) onde em virtude do aquecimento observam-se duas bandas, referentes à proteína Sm14r e seu dímero. Nas linhas 1 a 4 foram aplicados como controle, amostras de 4 clones de BCG/pAU5, onde se observam bandas inespecíficas. Nas linhas 5 a 8 foram aplicadas amostras de 4 clones de BCG/*sm14*, destacando-se em vermelho as bandas correspondentes a proteína Sm14r produzida em BCG, sendo visualizado também o dímero dessa proteína (Figura 4.3).

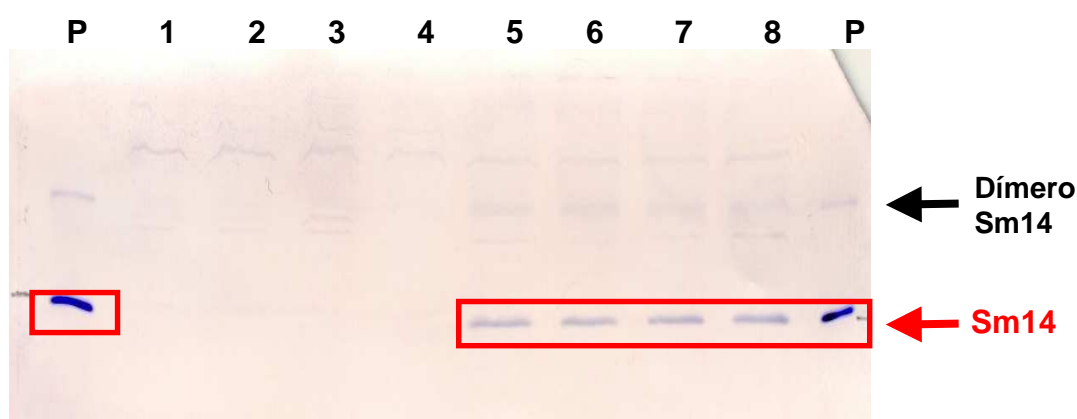


Figura 4.3 Expressão da proteína Sm14 produzida pelos quatro clones de BCG/*sm14* utilizados nos experimentos de infecção (linhas 5-8). Como controle foram usados 20 ng da proteína Sm14 (indicada pela letra P) e as proteínas totais dos quatro clones de BCG/pAU5 utilizados nos experimentos de infecção (linhas de 1-4).

4.4 Multiplicidade de infecção (MOI) BCG:THP-1

Para a determinação da melhor relação micobactéria-célula THP-1 a ser utilizada para se testar os BCG recombinantes, foi utilizada a quantificação da expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α , após 4 e 24 horas de infecção pela técnica de citometria de fluxo. Foi realizado um experimento onde foram testadas três relações micobactéria-célula THP-1: 5, 10 e 50 células de BCG-P para cada célula THP-1. Os resultados evidenciados e demonstrados na figura 4.4, indicam

que um percentual pequeno de células THP-1, mesmo sem estímulos, é capaz de secretar essas citocinas em nível basal (2,9%, 5,3%, 3,0% para IL-10, IL-12 e TNF- α , respectivamente). Estes percentuais permanecem estáveis após 4 horas de infecção com o BCG-P. Entretanto, após 24 horas de infecção com BCG-P, o percentual de células secretando IL-10 foi de 4,8%, 13,4% e 5,7% quando infectadas respectivamente por 5, 10 e 50 micobactérias-célula THP-1, indicando que para esta citocina a melhor relação micobactéria-célula THP-1 é de 10:1 (Figura 4.2). Para IL-12 foi possível observar que 4,8%; 12,7% e 6,1% das células infectadas expressavam esta citocina em resposta à mesma relação micobactéria-célula THP-1. Contudo, observamos um perfil diferente quanto à secreção de TNF- α , 10,5%, 5,97% e 4,23%, indicando que a melhor dose resposta foi obtida com a relação de 5 micobactérias-célula THP-1.

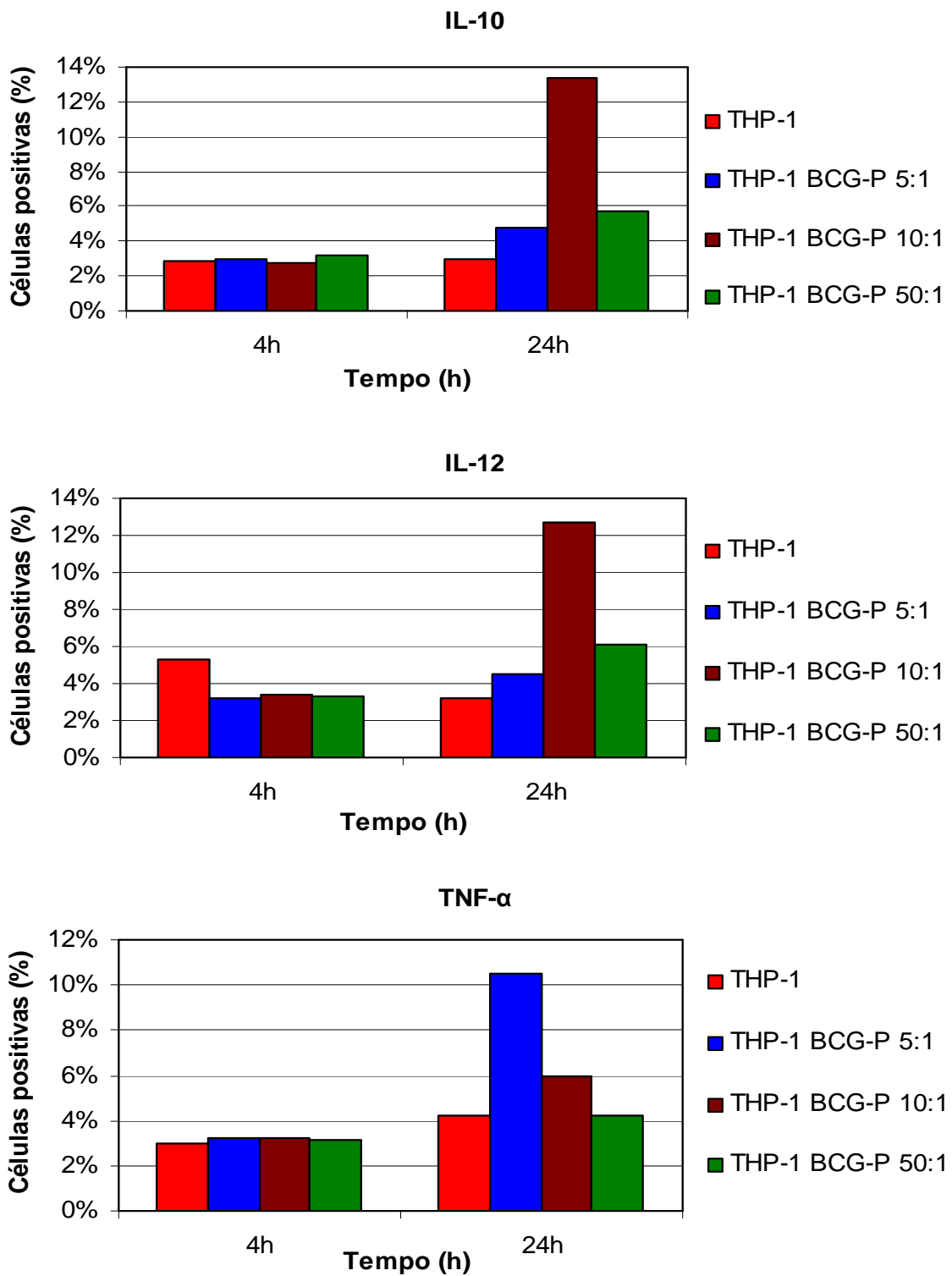


Figura 4.4. Expressão de IL-10, IL-12 e TNF- α em células THP-1 infectadas com *M. bovis* BCG sub-cepa Pasteur 1173P2 utilizando diferentes relações micobactéria-célula.

4.5 Capacidade de proliferação da célula THP-1 infectada pelo BCG/*sm14* e BCGs controles

A avaliação da capacidade de replicação das células THP-1 infectadas ou não pelo BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5) foi realizada pela técnica de proliferação celular através da absorção de timidina tritiada (cintilação). Os resultados obtidos em um experimento demonstram que as células THP-1 tiveram seu crescimento celular reduzido em mais de dois \log_{10} , 24 e 48 horas após a infecção com o BCG/*sm14* e os BCGs controles, não havendo diferença entre os BCGs. Os resultados indicam que a linhagem monocítica THP-1 tem sua diferenciação celular interrompida após infecção com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (Figura 4.5).

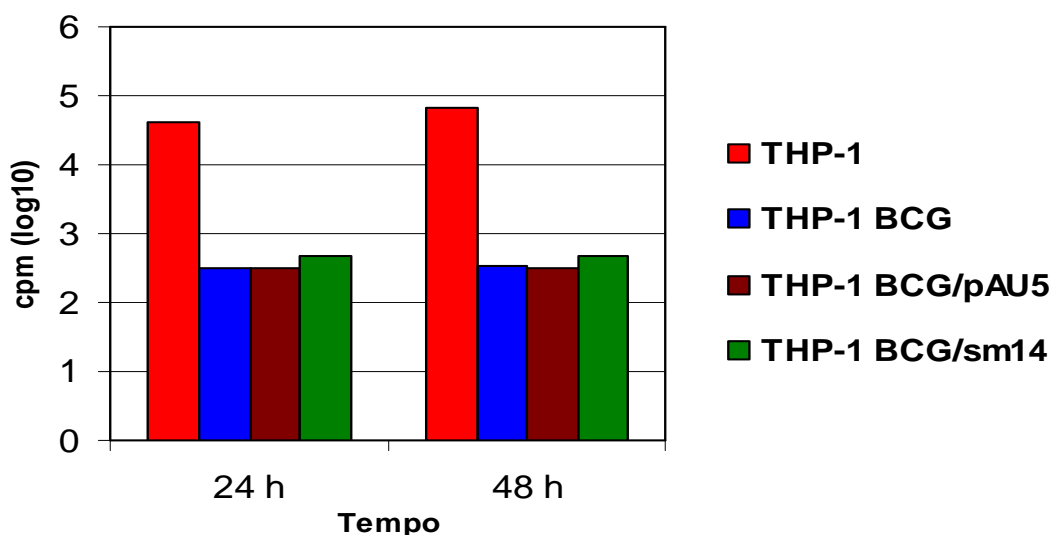


Figura 4.5: Atividade proliferativa das células THP-1 infectadas pelo BCG/*sm14* e pelos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5). Os resultados estão expressos em contagem por minuto (cpm).

4.6 Avaliação da viabilidade e estabilidade funcional (expressão do gene *kanR*) dos BCG/*sm14* e BCGs controles recuperados das células THP-1

A capacidade de infecção e manutenção do crescimento intracelular dos BCGs foi realizada em paralelo aos três experimentos de infecção com as cepas de BCG em células THP-1. A determinação comparativa das UFC dos cultivados em meio 7H11 seletivo (com canamicina – 7H11/Kan) e meio 7H11 não seletivo, permitiu avaliar a estabilidade funcional dos BCGs recombinantes (Figura 4.6).

Foi possível observar que de 3 a 7,5% dos BCGs não foram capazes de penetrar ou permanecerem aderidos a membrana das células THP-1, pois após 4 horas de infecção houve uma redução no número de bacilos utilizados para a infecção (tempo 0). Praticamente não houve diferença entre o número de bacilos recuperados entre o BCG/*sm14* e os BCGs controles, indicando que a presença do plasmídeo não alterou a capacidade dos BCGs recombinantes de penetrarem na célula.

Da mesma forma não observamos diferença entre os BCG/*sm14*, BCG-P e BCG/pAU5 quanto a capacidade de multiplicação intracelular, visto a manutenção entre o número de UFC recuperadas após 24 horas ($5,4 \log_{10}$, $5,7 \log_{10}$ e $5,4 \log_{10}$) e 48 horas ($5,3 \log_{10}$, $5,6 \log_{10}$ e $5,2 \log_{10}$). Uma redução entre 0,1 e $0,3 \log_{10}$ foi observada entre o período basal de 4 horas e após 24 e 48 horas.

Na avaliação da estabilidade funcional dos BCGs recombinantes, observamos que não houve diferença expressiva entre o cultivo dos BCG/*sm14* e BCG/pAU5 nos meios Middlebrook 7H11 e 7H11/Kan em todos os tempos avaliados. Como controle do meio seletivo, foram plaqueadas amostras de BCG, não sendo observado nenhum crescimento.

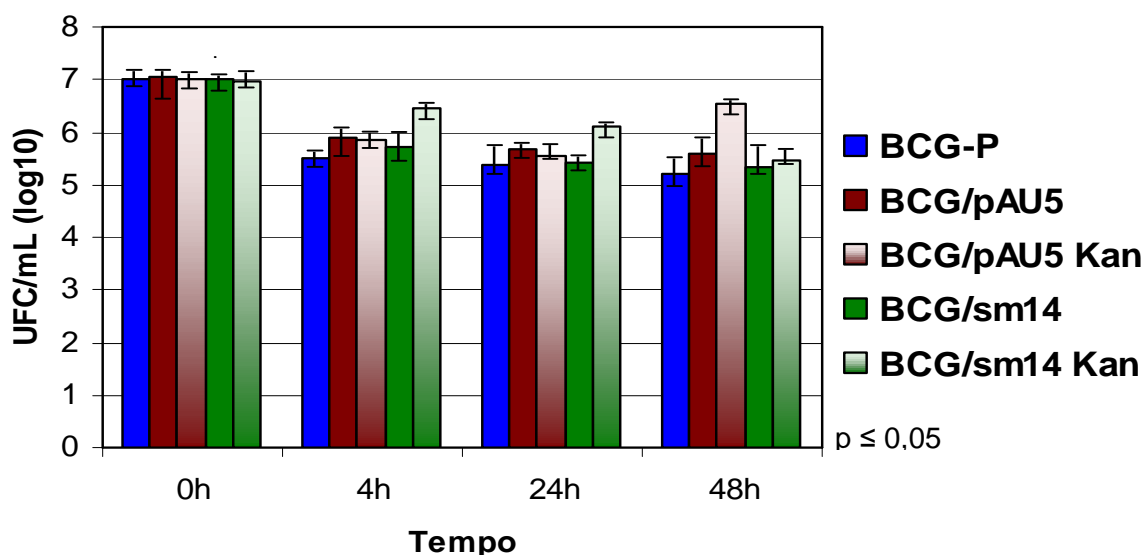


Figura 4.6 Gráfico da cinética da viabilidade do protótipo vacinal BCG/sm14 e dos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), recuperados de células THP-1 e cultivados nos meios Middlebrook 7H11 e 7H11/Kan (Três experimentos em triplicata).

4.7. Avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção do BCG/sm14 e BCGs controles em células THP-1 por imunocitoquímica

Para a detecção intracelular das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α produzidas pela infecção com BCG/sm14, BCG-P e BCG/pAU5 nas células THP-1 pela técnica de imunocitoquímica, com base na dissertação da Msc. Ana Teresa Gomes Fernandes (Fernandes 2003). Devido às dificuldades de adaptação deste procedimento à técnica de imunocitoquímica, foram avaliados diferentes parâmetros como condições de incubação dos anticorpos primários (1 hora a 25°C ou *overnight* a 4°C), tampões (HBSS, TBS-T, PBS-Saponina) e fixadores (paraformaldeído 4% ou acetona PA). Após observação morfológica por microscopia óptica (1000 x), determinou-se que os anticorpos primários deveriam ser incubados com as amostras a 4°C por 16-18 horas (*overnight*), sendo utilizado o tampão TBS-T e as amostras fixadas com paraformaldeído 4%.

Foi possível identificar por esta metodologia a produção de citocinas pelas células THP-1 (Figura 4.7). O percentual de células expressando cada citocina foi determinado após 4, 24 e 48 horas de infecção pelo BCG-P, BCG/pAU5 e BCG/sm14 através da média de três experimentos, sendo demonstrado o desvio padrão pela barra de erro. A expressão basal destas citocinas foi também determinada em células não infectadas, onde se observou que a citocina IL-10 foi

expressa por 5,0%, 10,7% e 6,4% das células THP-1, sendo que 8,8%, 8,2% e 3,4% produziram IL-12 e 3,6%, 6,5% e 2,2% expressaram TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente. Após a infecção com BCG-P, 5,9%, 6,5% e 5,5% expressavam IL-10; 9,45%, 4,6% e 6,1% expressaram IL-12 e 6,8%, 6,4% e 5,2% TNF- α , durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente. Na infecção de células THP-1 com o recombinante controle BCG/pAU5, 7,3%, 9,9% e 2,9% expressaram IL-10, na produção de IL-12 foram observados 9,9%, 8,3% e 7,1% de células e 4,1%, 5,5% e 1,5% de células produziram TNF- α . Durante a infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, foram detectadas 5,3%, 9,3% e 6,2% de células expressando IL-10; 9,4%, 10,4% e 4,3% de células produtoras de IL-12 e 4,5%; 7,1% e 6,0% de células fabricantes de TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente (Figura 4.7).

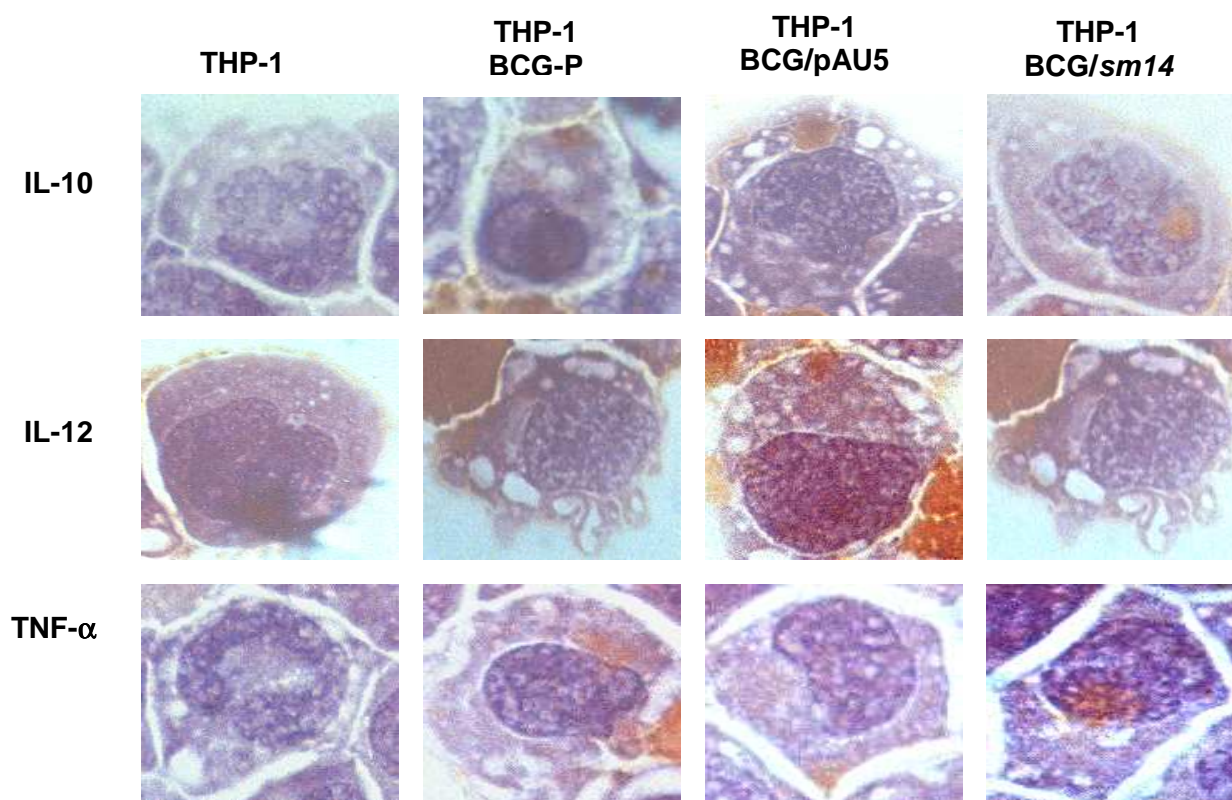


Figura 4.7 Microscopia óptica (1000 x) de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após 24 horas de infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), detectadas por imunocitoquímica.

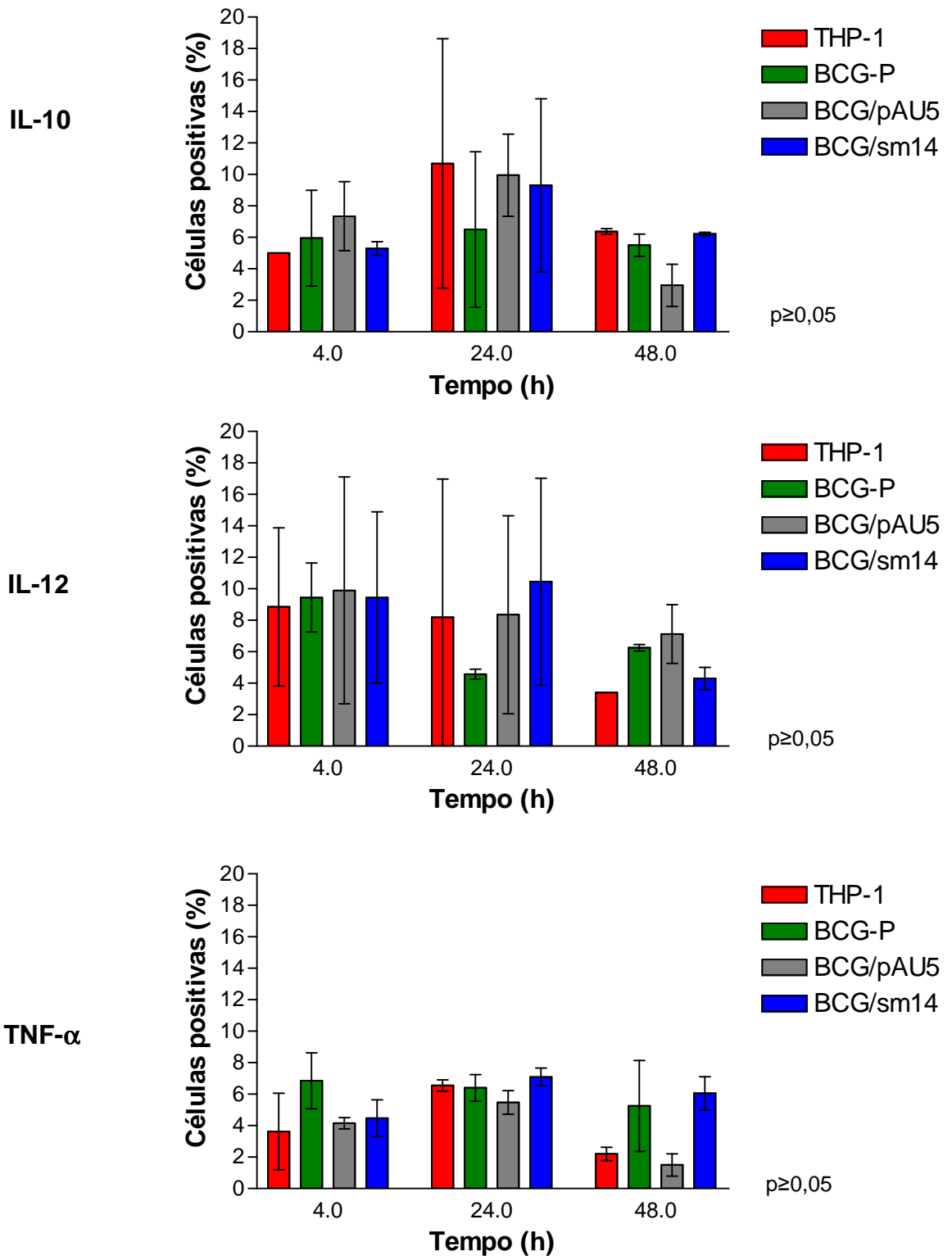


Figura 4.8 Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por imunocitoquímica (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

4.8 Avaliação das citocinas a partir da infecção do BCG/*sm14* e BCGs controles em células THP-1 por Citometria de Fluxo

Para a detecção intracelular das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α produzidas pela célula THP-1 e pela infecção com BCG/*sm14*, BCG-P ou BCG/pAU5 em células THP-1 pela técnica de citometria de fluxo, inicialmente foi determinada a região de análise a partir da leitura de uma amostra das células THP-1 incubada a 37°C em ambiente com 5% CO₂ por 4 horas, sendo comparada a relação tamanho/granulosidade, objetivando excluir tanto restos celulares quanto grumos celulares (Figura 4.8).

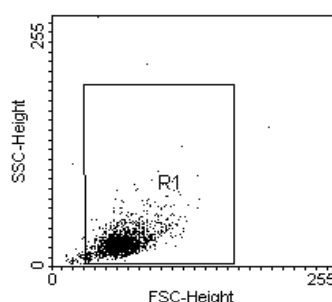


Figura 4.9 Determinação da região de análise das células THP-1 mantidas em cultivo celular. A região de análise (R1) foi determinada excluindo-se os restos celulares. Pode-se observar uma grande variabilidade quanto ao tamanho das células, visto se tratar de células em diferenciação.

Os resultados estão expressos nas figuras 4.9 a 4.12, mostrando a média de três experimentos, sendo evidenciado o desvio padrão pela barra de erro. Na detecção da produção de citocinas pelas células THP-1 sem estímulos, observou-se que a citocina IL-10 foi expressa por 3,2%, 8,1% e 11,4% das células THP-1, sendo que 2,7%, 4,6% e 8,1% das células THP-1 produziram a citocina IL-12 e 3,0%, 5,9% e 5,4% das células THP-1 expressaram TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas.

A infecção com BCG-P em células THP-1 gerou durante os tempos de infecção, 3,3%, 6,9% e 13,4% de células produtoras de IL-10; 2,0%, 5,5% e 12,0% de células expressando IL-12 e 4,2%, 5,4% e 11,4% de células sintetizando TNF- α .

Na infecção com o controle BCG/pAU5 em células THP-1, 3,3%, 6,2% e 12,3% expressaram IL-10, na produção de IL-12 foram detectados 4,3%, 4,6% e 10,2% de células e 4,0%, 3,9% e 11,3% de células produziram TNF- α .

Durante a infecção do BCG/*sm14* em células THP-1, foram detectados 3,2%, 7,9% e 12,9% de células expressando IL-10; 3,1%, 4,8% e 9,0% de células produtoras de IL-12 e 2,7%, 3,4% e 11,4% de células fabricantes de TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente.

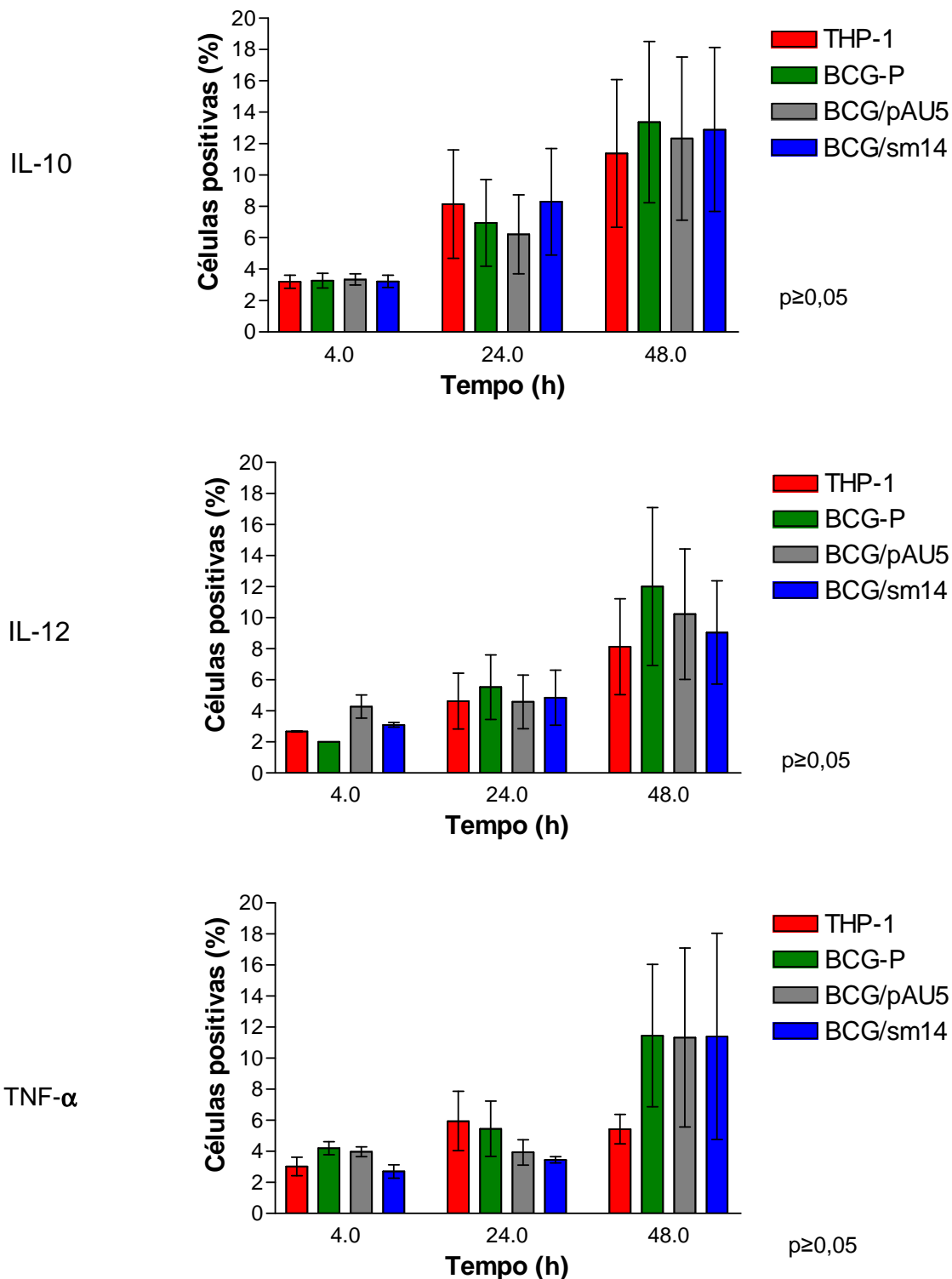


Figura 4.10: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 TNF- α e após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por citometria (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

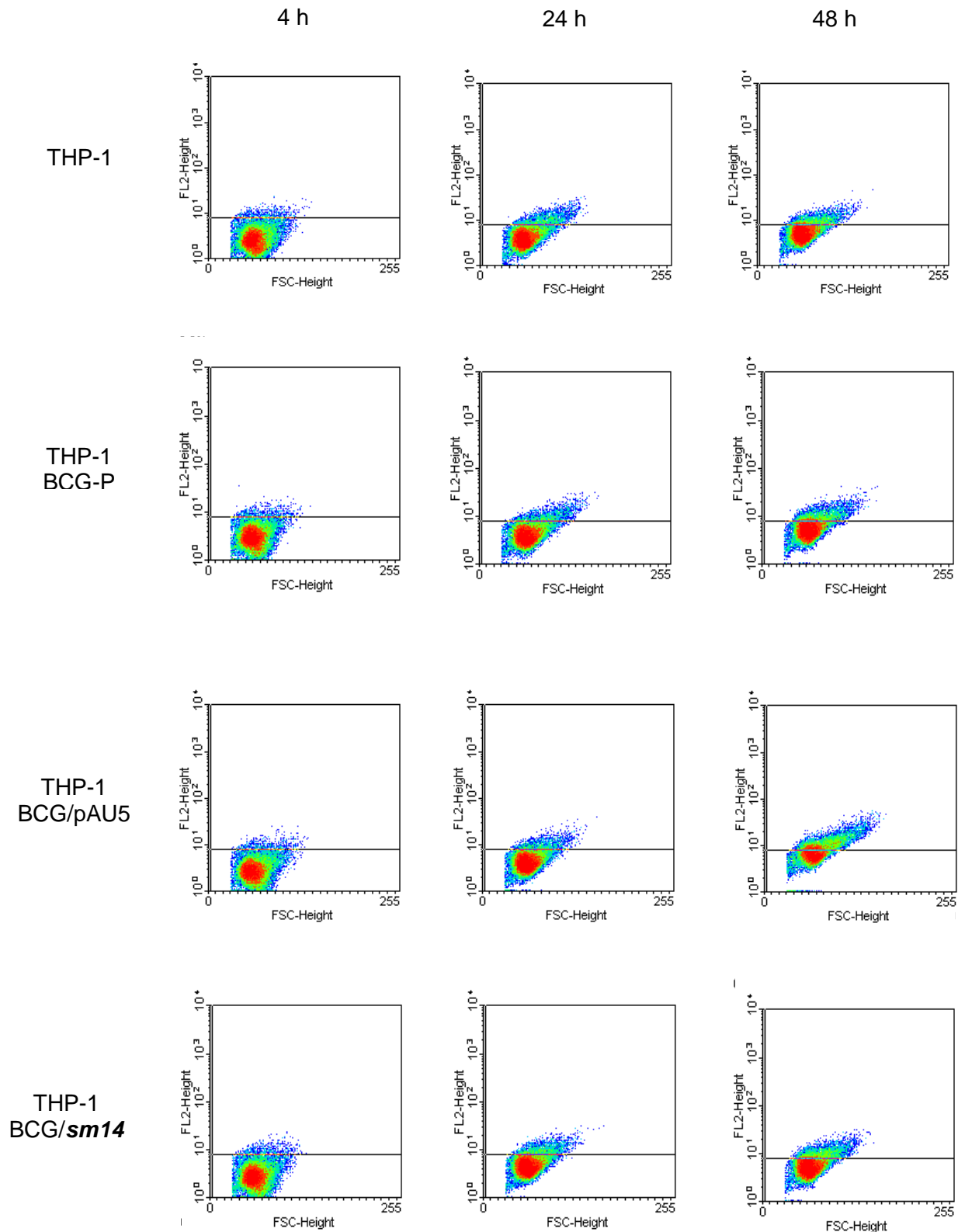


Figura 4.11: Gráfico tamanho (FSC) *versus* fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria (Experimento III).

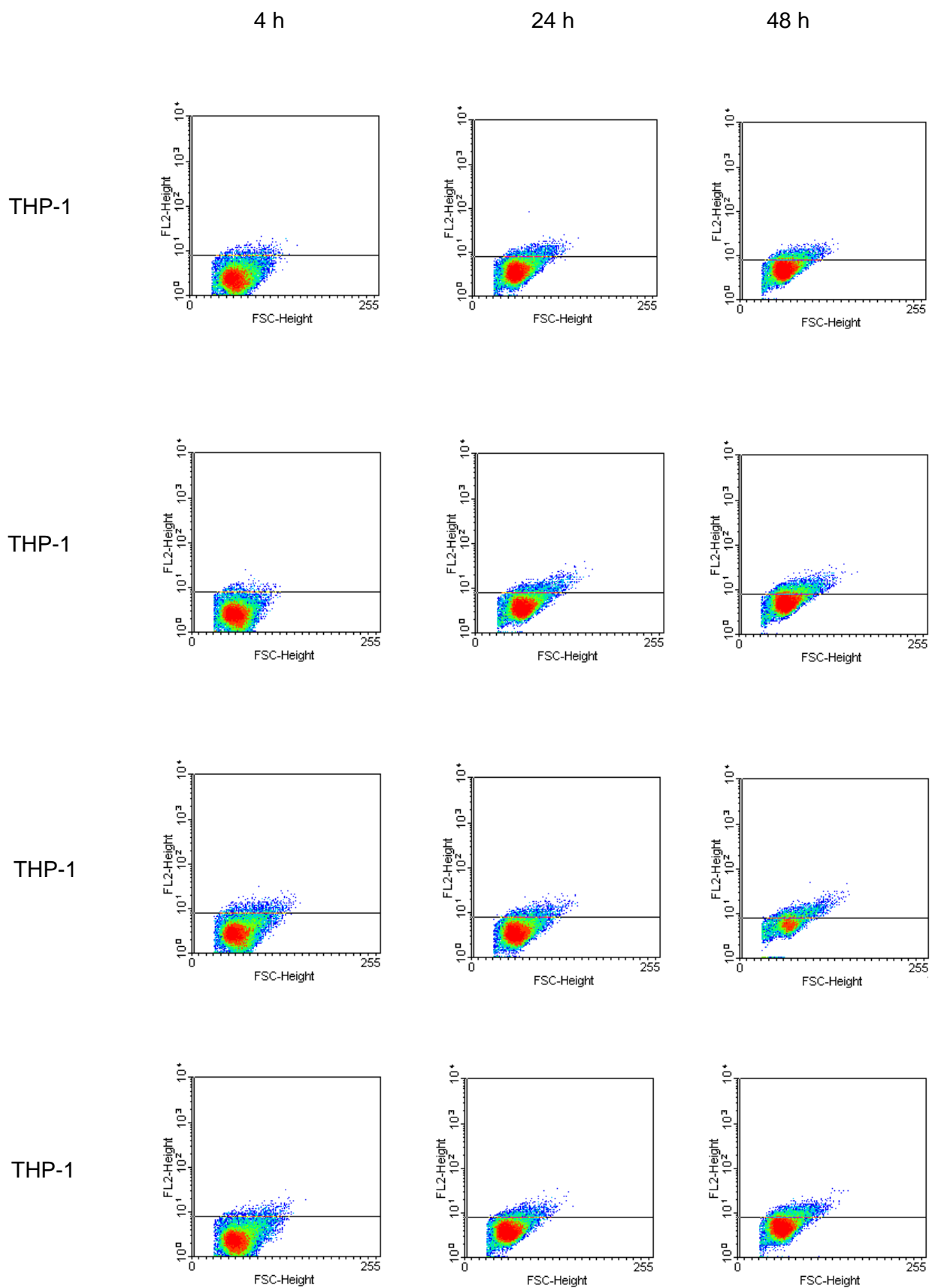


Figura 4.12: Gráfico tamanho (FSC) versus fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/sm14 e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por citometria (Experimento III).

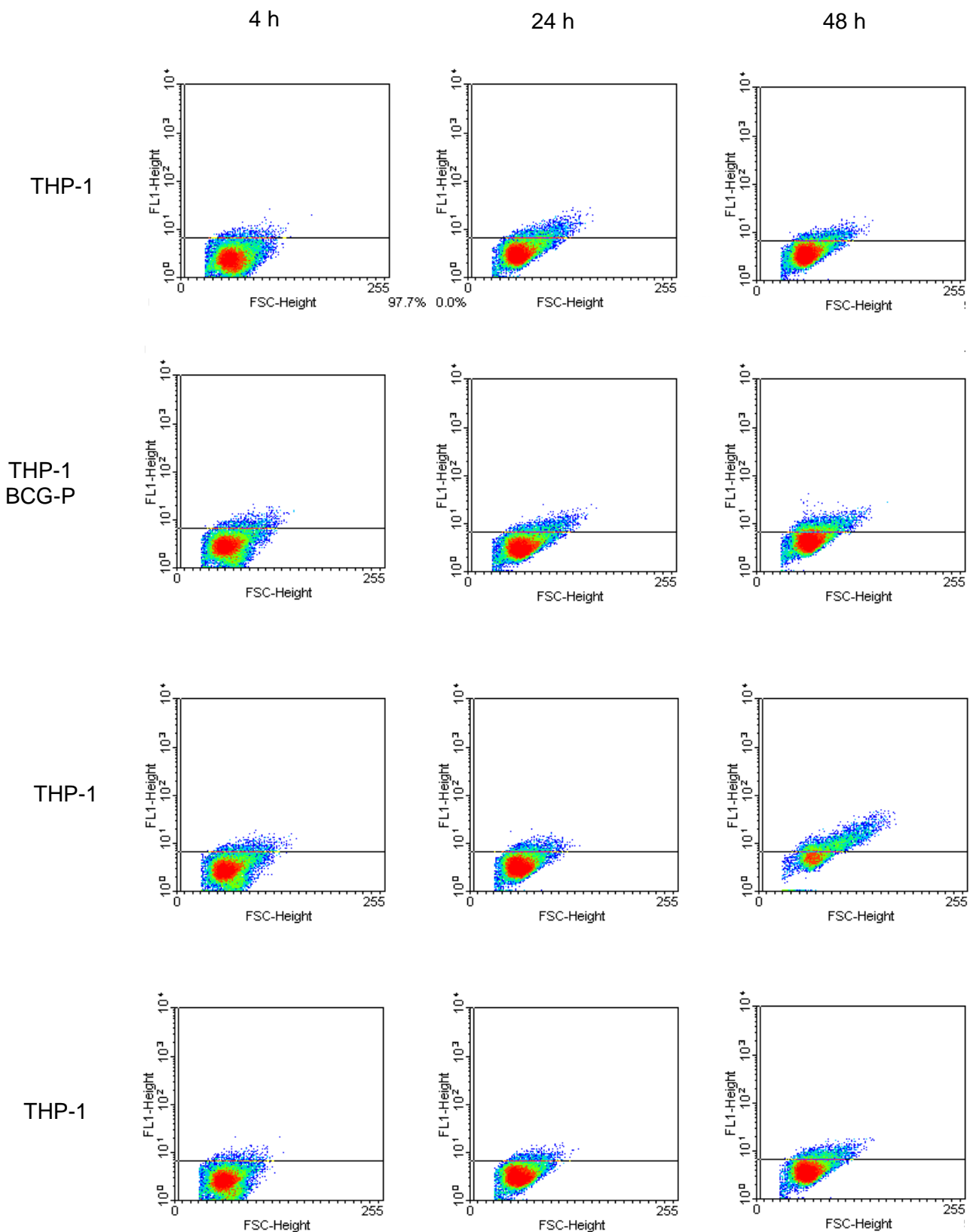


Figura 4.13: Gráfico tamanho (FSC) *versus* fluorescência (FL1 ou FL2) da avaliação de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por citometria (Experimento III).

4.9 Comparação entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo

As células THP-1 infectadas ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles foram avaliadas quanto à produção das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α durante os períodos de 4, 24 e 48 horas, pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo.

4.9.1 Detecção de IL-10

A detecção de células THP-1 produtoras de IL-10 a partir da infecção ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), estão apresentadas na figura 4.13. Nas células THP-1 não infectadas, observa-se uma variação entre 1,8% e 2,6% de células positivas na avaliação pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo nos tempos de 4 horas (5,0% e 3,2%, respectivamente) e 24 horas (8,1% e 10,7%, respectivamente), ocorrendo uma inversão na variação do número de células produtoras de IL-10, no período de 48 horas (6,4% e 11,4%, respectivamente).

Na infecção com BCG-P em células THP-1 revela-se que no período de 4 horas há variação do número de células positivas detectadas pelas duas técnicas (5,9% imunocitoquímica e 2,0% citometria). Já nos períodos de 24 e 48 horas evidencia-se uma variação de 1,0% (5,5% e 6,5%, respectivamente), sendo observado de forma similar às células THP-1 uma inversão entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (5,5% e 12,0%, respectivamente).

Na infecção com BCG/pAU5 em células THP-1 avista-se uma variação de 4,0% do número de células positivas (7,3% e 3,3%, respectivamente) em 4 horas de infecção. No tempo de 24 horas, mantém-se a variação (9,9% e 6,2% respectivamente). No entanto, no tempo de 48 horas de infecção, a porcentagem de células expressando IL-10 detectada pela técnica de imunocitoquímica diminui para 2,9% enquanto pela técnica de citometria de fluxo, aumenta praticamente quatro vezes em relação à porcentagem observada no tempo de 24 horas (12,3%).

Na infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, nos tempos de 4, 24 e 48 horas, avalia-se inicialmente uma variação de 2,1% na detecção de IL-10 pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (5,3% e 3,2%, respectivamente) no tempo de 4 horas. No tempo de 24 horas visualizamos uma pequena queda na variação dos valores obtidos entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria

(9,3% e 7,9% respectivamente). observa-se uma inversão do número de células positivas no tempo de 48 horas (6,2% e 12,9% respectivamente).

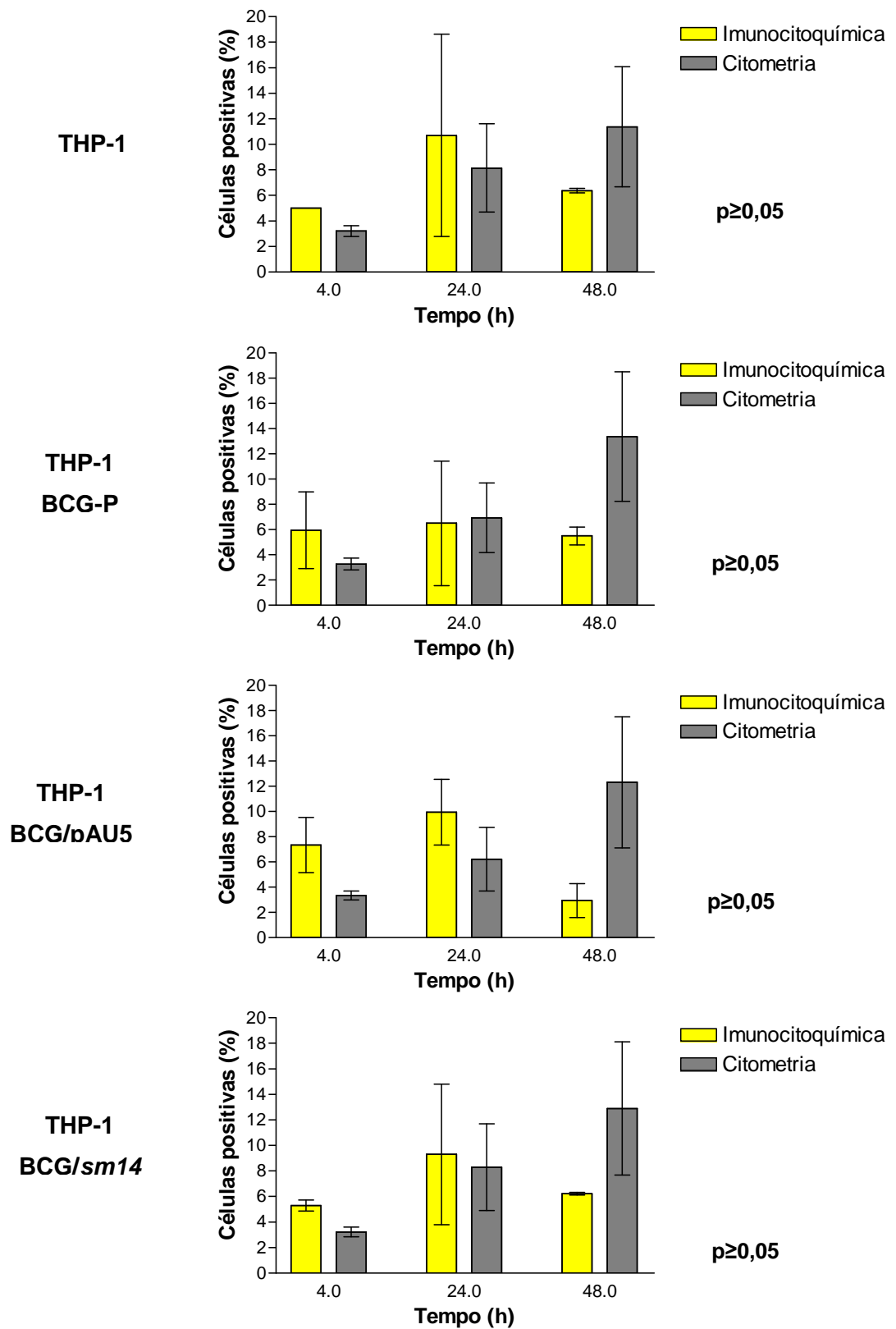


Figura 4.14: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por imunocytoquímica e citometria de fluxo (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

4.9.2 Detecção de IL-12

A detecção de células THP-1 produtoras de IL-12 a partir da infecção ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), estão apresentadas na figura 4.14. Nas células THP-1 não infectadas, observa-se uma variação na detecção de células positivas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (8,8% e 2,7%, respectivamente). No período de 24 horas, mantém-se praticamente inalterado o número de células produtoras de IL-12 avaliado pela técnica de imunocitoquímica (8,2%) e um aumento na porcentagem de células positivas avaliados pela técnica de citometria de fluxo (4,6%). No tempo de 48 horas as porcentagens de células THP-1 positivas foram de 3,4% e 8,1% nas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

Na infecção com BCG em células THP-1 revela-se que no período de 4 horas, os valores obtidos foram de 9,4% e 2,0% de células positivas identificadas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria, respectivamente. No período de 24 horas evidencia-se um decréscimo de 4,8% de células avaliadas pela técnica de imunocitoquímica (4,6%) e um aumento de 3,5% de células avaliadas pela técnica de citometria de fluxo. A mesma tendência de inversão na variação dos valores obtidos pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria no tempo de 48 horas após infecção é evidenciado (6,1% e 12,0%, respectivamente).

Na infecção com BCG/pAU5 em células THP-1 avista-se uma variação do número de células positivas detectadas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria no tempo de 4 horas (9,9% e 4,3%). Após 24 horas de infecção, ocorre uma diminuição de 1,6% do número de células positivas determinadas pela técnica de imunocitoquímica e aumento de 0,3% de células positivas avaliadas pela técnica de citometria. Já no tempo de 48 horas de infecção, a porcentagem de células expressando IL-12 detectada pela técnica de imunocitoquímica diminuiu para 7,1% e pela técnica de citometria de fluxo a porcentagem de células positivas aumentou para 10,2%.

Na infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, observa-se uma variação de mais de 6,0% na detecção de IL-12 pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (9,4% e 3,1%, respectivamente) no tempo de 4 horas. No tempo de 24 horas há um aumento de 1,0% no número de células positivas detectadas pela técnica de imunocitoquímica (10,4%) semelhante ao aumento de 1,7% detectado pela técnica de citometria de fluxo (4,8%). Em 48 horas de infecção, foram

detectados 4,3% e 9,0% de células produtoras de IL-10 pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

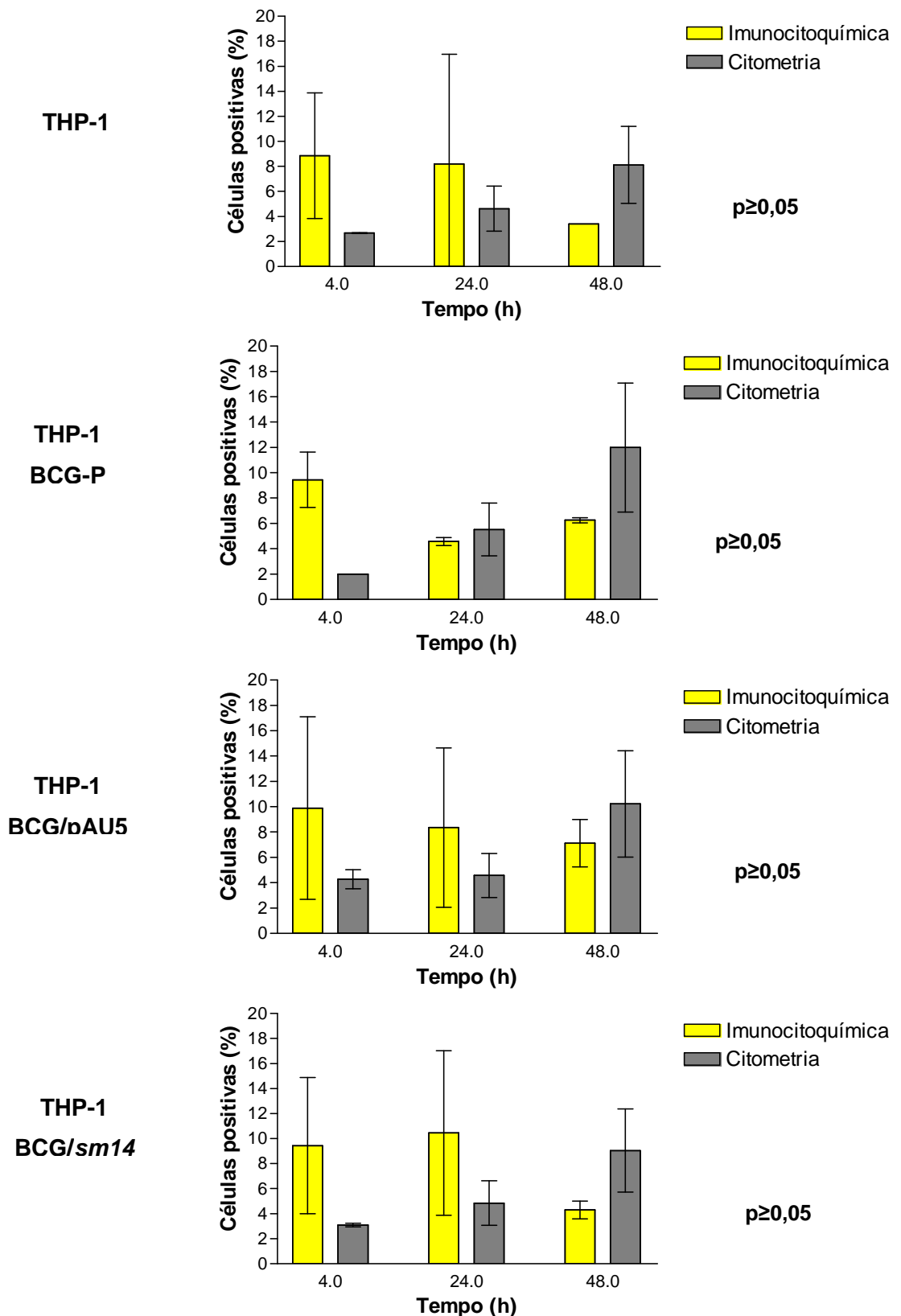


Figura 4.15: Percentagem de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

4.9.3 Detecção de TNF- α

A detecção de células THP-1 produtoras de TNF- α a partir da infecção ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), estão apresentadas na figura 4.15. Nas células THP-1 não infectadas, detecta-se no período de 4 horas os valores de 3,6% e 3,0% de células positivas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente. No tempo de 24 horas, ocorre um aumento do número de células produtoras de IL-12 avaliado tanto pela técnica de imunocitoquímica (6,5%) como pela técnica de citometria de fluxo (5,9%). No tempo de 48 horas as porcentagens de células THP-1 positivas foram de 2,2% e 5,4% nas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

Na infecção com BCG em células THP-1 revela-se que no período de 4 horas os valores detectados de células positivas pelas duas técnicas foram de 6,8% pela técnica de imunocitoquímica e 3,0% pela técnica de citometria de fluxo. Já nos períodos de 24 e 48 horas evidenciam-se 6,4% e 5,2%, respectivamente, de células positivas na leitura pela técnica de imunocitoquímica. Nesses mesmos períodos, os valores da leitura pela técnica de citometria de fluxo os valores de células produtoras de TNF- α foram semelhantes (5,9% e 5,4% respectivamente).

Na infecção com BCG/pAU5 em células THP-1 avistam-se os valores de 4,1% e 4,0% de células positivas em 4 horas de infecção pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente. No tempo de 24 horas, há um aumento do número de células expressando TNF- α detectadas pela técnica de imunocitoquímica enquanto pela citometria de fluxo o valor de células positivas mantém-se inalterado (5,5% e 3,9%, respectivamente). Já no tempo de 48 horas de infecção, a porcentagem de células expressando TNF- α detectada pela técnica de imunocitoquímica diminui para 1,5% e na técnica de citometria de fluxo aumenta consideravelmente em relação à porcentagem observada nos tempos de 4 e 24 horas (11,3%).

Na infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, nos tempos de 4, 24 e 48 horas, observa-se inicialmente os valores de 4,5% e 3,1% de células produtoras de TNF- α identificadas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo no tempo de 4 horas de infecção. No tempo de 24 horas há um aumento de células positivas detectadas em ambas as técnicas (7,1% e 4,8% respectivamente). Em 48 horas de infecção, foram detectadas 6,0% e 9,0% de células produtoras de TNF- α pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

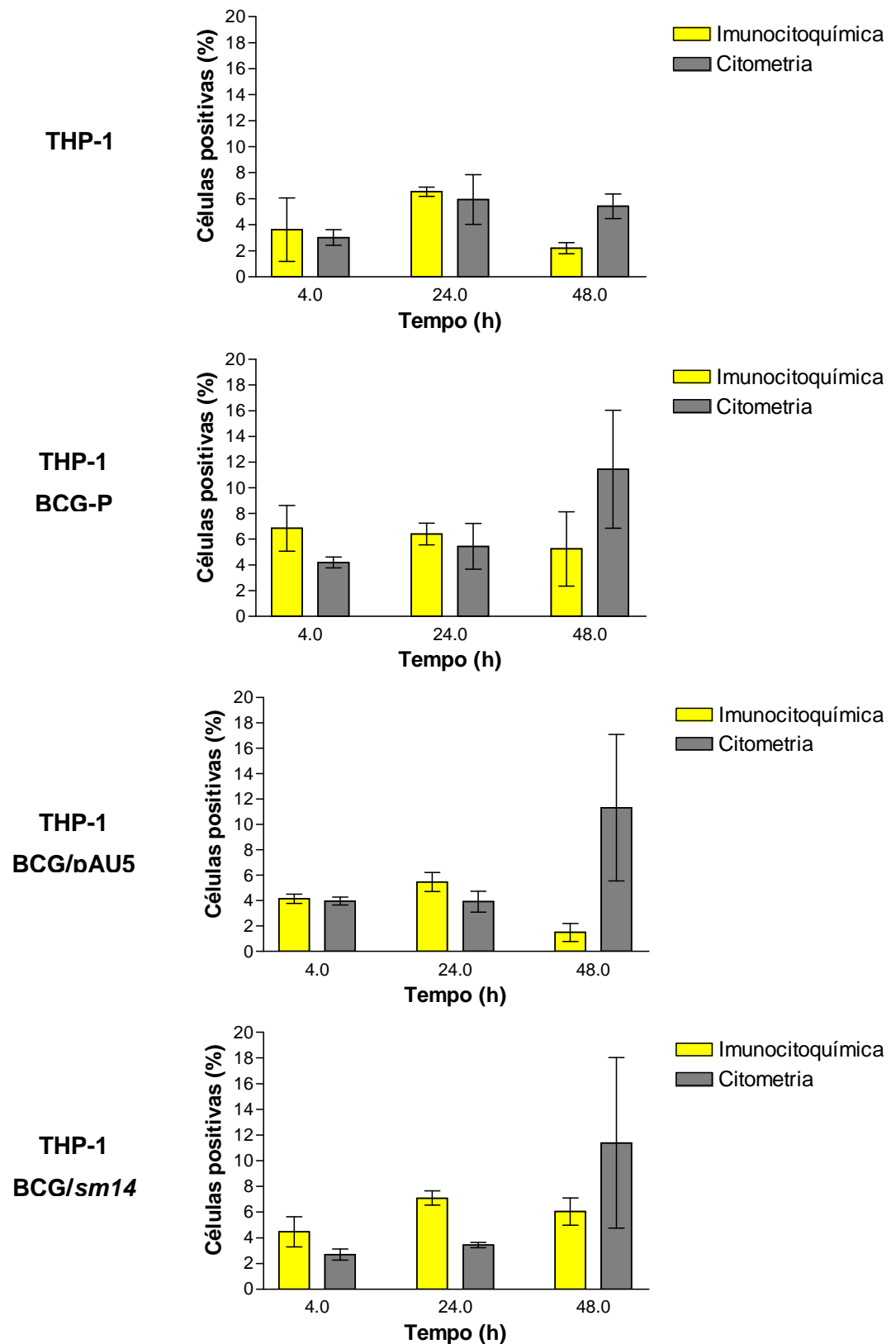


Figura 4.16: Percentagem de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

Os resultados obtidos por ambas as técnicas, apesar de divergentes entre si, não permitiram identificar diferenças no perfil de citocinas fabricadas pelas células THP-1 infectadas pelo BCG/*sm14* e pelos BCGs controles.

5. DISCUSSÃO

Devemos considerar alguns pontos importantes para se estudar a resposta imune desencadeada por protótipos vacinais, bem como sua eficácia. Dentre eles, podemos indicar a impossibilidade de se realizar experimentos em seres humanos sem prévios estudos *in vitro* em células humanas e/ou de animais e *in vivo* em animais de experimentação, apesar de sabermos que estes não reproduzem fielmente toda a gama de indução da resposta imune observado no homem (Metz *et al* 2002). Outras questões sobre o uso de animais em experimentação envolvem o benefício potencial contraposto ao sofrimento animal, aspectos legais, morais e éticos. Por estas razões um grande esforço vem sendo realizado na busca de métodos alternativos que sejam capazes de substituir, diminuir ou refinar os métodos de utilização de animais em experimentação, conforme descrito na teoria dos “3 Rs” – *Replacement* (substituição), *Refinement* (refinamento) e *Reduction* (redução) - descrita por Russell e Burch em 1959 (Dellepiane, Griffiths & Milstien 2000, Metz *et al.* 2002, Presgrave 2003).

A grande pressão internacional sobre as indústrias de fármacos, cosméticos e imunobiológicos que são grandes usuárias de animais no desenvolvimento, produção e testes de eficácia e segurança de produtos no sentido de buscarem a validação e aplicação de novas técnicas baseadas nos 3Rs, levou a criação de órgãos como o *Fund for Replacement of Animal Medical Experiments* (FRAME) que, desde 1983, edita uma revista internacional intitulada *Alternatives to Laboratory Animals* (ATLA). Em 1994, foi inaugurado o Centro Europeu para a validação de métodos alternativos (*European Centre for the Validation of Alternative Methods* - ECVAM). Outras instituições, como *Cosmetic, Toiletries and Frangrance Association* (CTFA), *Interagency Regulatory Alternatives Group* (IRAG), *Food and Drug Administration* - EUA (FDA) também atuam nos estudos de relevância e confiabilidade de propostas alternativas, pela pesquisa dos métodos atualmente utilizados e o desenvolvimento e validação de novos testes, para que os produtos químicos e os produtos de várias espécies possam ser manufaturados de forma mais segura e econômica, visando reduzir o uso e minimizar o sofrimento dos animais (Balls 2002, Hendriksen 2005).

Um dos métodos alternativos para substituição ou pelo menos diminuição do uso de animais nas fases de desenvolvimento, produção e testes de algumas vacinas é a adoção de sistemas de ensaios *in vitro*, dentre os quais podemos

destacar o uso de cultura de células (Metz *et al* 2002, Presgrave 2002, Presgrave 2003). A principal vantagem da utilização *in vitro* de cultivos celulares é o controle do ambiente de cultura, podendo-se controlar condições físico-químicas (pH, temperatura, pressão osmótica, níveis de oxigênio (O₂) e CO₂, tensão superficial) e fisiológicas (hormônios, fatores de crescimento, densidade celular), que podem ser mantidas relativamente constantes (Doyle & Griffiths 1998, Freshney 2000a). Outras vantagens relevantes são: a homogeneidade das células em cultivo em relação à morfologia e especificidades uniformes, podendo com facilidade obter um número elevado de réplicas idênticas, superando assim o problema de heterogeneidade de amostras, reduzindo a variação e o custo dos experimentos, possibilitando a realização de múltiplos testes com muitas variáveis (Doyle & Griffiths 1998, Freshney 2000a).

A técnica de cultura de células integrada com sistemas computacionais e a hierarquização de métodos podem ser ferramentas importantes para etapas do desenvolvimento de protótipos vacinais (Figura 5.1), sendo utilizada principalmente para procedimentos de seleção (*screening*) de vacinas candidatas na fase pré-clínica (Henriques & Sampaio 2002, Larsen 2005).

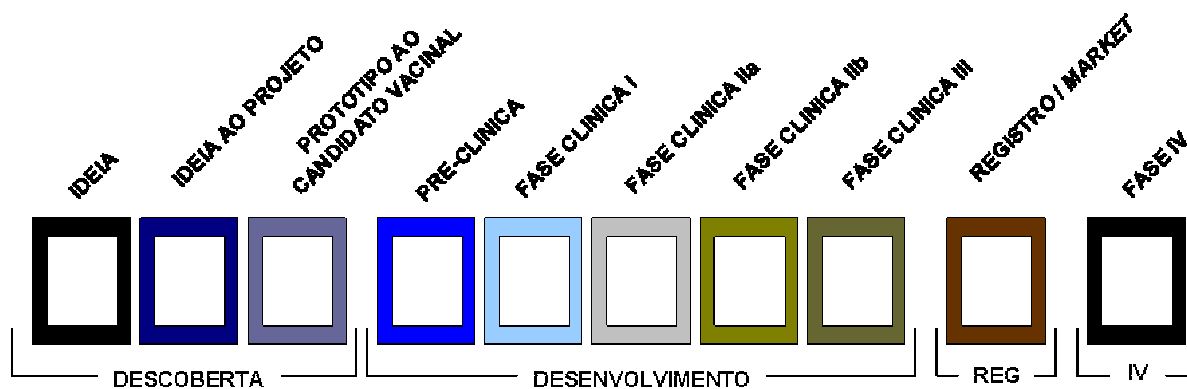


Figura 5.1: Modelo esquemático das etapas necessárias para implantação de novos fármacos e imunobiológicos (Adaptado de Larsen 2005).

Este estudo visou o desenvolvimento de um protocolo para a seleção de protótipos vacinais utilizando como modelo *M. bovis* BCG sub-cepça Pasteur expressando o antígeno Sm14 de *Schistosoma mansoni* e a linhagem de monócitos humanos THP-1 como substrato celular. Contudo, a eficiência da resposta imune induzida por BCGs recombinantes é dependente da capacidade de expressão da proteína heteróloga, uma vez que essa expressão pode interferir na

ativação celular. Assim, confirmamos a expressão da proteína Sm14 por todos os clones do protótipo vacinal BCG/*sm14*, e nossos resultados corroboram com relatos anteriores Argondizzo (2005), utilizando o mesmo sistema de expressão. Desta forma, assumimos que todos os recombinantes BCG/*sm14* estavam expressando a proteína de interesse em quantidade suficiente para o prosseguimento dos experimentos de infecção com os protótipos vacinais em linhagens monocíticas.

Para a realização dos ensaios de infecção de células THP-1 com o BCG/*sm14*, foi necessário determinar a MOI capaz de induzir a melhor dose resposta para a expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α . Assim sendo, foram avaliadas três diferentes relações, 5, 10 e 50 BCGs para cada célula THP-1. Os resultados obtidos mostram que o fato da MOI de 50 BCG:THP-1 não ter estimulado adequadamente a expressão de citocinas, sugere que esta concentração de BCG promove perda da viabilidade de células THP-1 (Hassan *et al* 2006). Por outro lado, a MOI de 10 de BCG/THP-1 estimula uma maior porcentagem de células produtoras de IL-10 e IL-12, tendo sido considerada, portanto a melhor dose-resposta para a síntese das citocinas neste estudo. Entretanto, ao contrário do observado por Oliveira, Charlab & Pessolani (2001), que na análise das MOI de 1, 10 e 100 de BCG e *M. leprae* para cada célula THP-1, concluíram que a relação de 10:1 de micobactérias-célula THP-1 induz uma maior produção de TNF- α , no presente trabalho a MOI de 5 BCGs apresentou o melhor resultado com relação às células produtoras de TNF- α . Atkinson e colaboradores (2000), realizaram de forma semelhante uma pesquisa do perfil de citocinas (IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α) expressas por linhagem primária de macrófagos humanos infectadas com MOI de 0,2, 1 e 5 BCGs, concluindo que a MOI de 5 BCG/célula induz de forma eficiente a expressão das citocinas IL-10 e TNF- α por macrófagos infectados. Devido a divergências entre os resultados obtidos neste trabalho e os resultados relatados na literatura para determinar a relação padrão para avaliação de citocinas a partir da interação BCG-macrófago, e como o maior percentual de células expressando IL-10 e IL-12 foi atingido com a relação de 10 BCG para cada célula THP-1, optamos por usar esta proporção nos ensaios de imunocitoquímica e citometria para a quantificação das células produtoras de citocinas infectadas com o protótipo vacinal BCG/*sm14*.

Dentre os requerimentos para se determinar o sucesso de protótipos vacinais está a indução e ativação das APCs, que irão realizar o processamento de antígenos, a expressão de fatores co-estimulatórios, secreção de citocinas e a

apresentação antigênica às células T, tornando-se essenciais para o desencadeamento da resposta imune (Ada 2004). Neste contexto, utilizamos uma linhagem de monócitos humanos como modelo para infecção, recuperação e análise do perfil de citocinas (IL-10, IL-12 e TNF- α) expressas em células THP-1 após infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14*. Vários autores têm utilizado esta linhagem celular como modelo de averiguação do perfil de ativação celular em monócitos (Diaz-Silvestre *et al.* 2005, Xia *et al.* 2005, Ciabattini *et al.* 2006) ou células maduras – macrófagos (Oliveira, Charlab & Pessolani 2001, Lewis *et al.* 2003, Theus, Cave & Eisenach 2004, Theus, Cave & Eisenach 2005, Hasan *et al.* 2006).

Da mesma forma, autores como Takahashi (2003), Ada (2004) e Plotkin (2005a), destacam que o reconhecimento e a ativação das APCs podem ser considerados como etapas relevantes para avaliação de protótipos vacinais e para o sucesso vacinal. Os monócitos são importantes células efetoras capazes de responder rapidamente a estímulos imunes de diferentes formas, como produção de proteínas inflamatórias, expressão de moléculas de adesão em sua superfície, ativação e diferenciação em macrófagos. Neste contexto, utilizamos a cintilografia para o acompanhamento da proliferação da célula THP-1 infectada ou não com o protótipo vacinal BCG/*sm14*, com a amostra vacinal de BCG Pasteur e com a construção BCG/pAU5. A medição de partículas beta emitidas pela timidina-H³ captada pelas células THP-1, nos permite determinar a capacidade do protótipo vacinal de ativar as células THP-1 e modificar seu estado de célula jovem, indiferenciada (monócitos) e transformá-las em células ativadas (macrófagos), a partir da redução de sua capacidade de replicação (Bennett *et al.* 1993). Nas condições avaliadas, nossos resultados mostram que as amostras de BCGs utilizadas para infectar as células THP-1 foram capazes de estimular esta linhagem, não sendo evidenciada diferenças no perfil de ativação induzido pela amostra vacinal de BCG, o protótipo vacinal BCG/*sm14* e a construção BCG/pAU5. Como a ativação dos monócitos/macrófagos não é específica, não podemos determinar o “quanto” a proteína Sm14 foi responsável pela diferenciação celular. Experimentos futuros devem ser desenhados para determinar neste sistema a capacidade de ativação da proteína Sm14.

Além da avaliação da proliferação de células THP-1, autores como Medeiros (2001), Varaldo e colaboradores (2004) e Argondizzo (2005), assinalaram a necessidade de avaliarmos a capacidade de infecção e a manutenção do

crescimento intracelular de protótipos vacinais baseados na tecnologia do BCG recombinante em culturas de monócito/macrófago. Com esse objetivo, montamos um experimento para acompanhar a cinética de crescimento do BCG/*sm14*, em paralelo com os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5) empregados na infecção e na recuperação em células THP-1, nos tempos de 4, 24 e 48 horas. Nossos dados assemelham-se com os descritos na literatura (Medeiros 2001, Varaldo *et al.* 2004, Argondizzo 2005), não detectando diferenças significativas na capacidade de infecção e de crescimento intracelular entre as amostras de BCG testadas, sendo visualizada uma pequena redução do número de UFC recuperadas entre o período basal de 4 horas e após 24 e 48 horas. Podemos concluir que nas condições estudadas o protótipo vacinal BCG/*sm14* possui a mesma aptidão de infecção e persistência intracelular da amostra vacinal BCG Pasteur e da construção BCG/pAU5, favorecendo seu uso como protótipo vacinal.

Devido à problemática da estabilidade de plasmídeos recombinantes, a qual interfere fundamentalmente com a expressão da proteína heteróloga por vacinas recombinantes baseadas em vetores vivos atenuados e, evidentemente, na plataforma do BCG recombinante (Haeseleer 1994), realizou-se a avaliação da estabilidade funcional do BCG transformado com o plasmídeo pAU5-*sm14* (BCG/*sm14*). A capacidade dos BCGs recombinantes (BCG/*sm14* e BCG/pAU5) de manterem o fenótipo de resistência para canamicina (Kan), mostra que não há diferença expressiva entre os BCGs recombinantes cultivados nos meios seletivo (7H11+Kan) e não seletivo (7H11). Esses resultados confirmam os dados obtidos no trabalho realizado por Argondizzo (2005) e são extremamente importantes para o desenvolvimento de vacinas baseada na utilização do BCG como vetor vivo atenuado de imunógenos, porque demonstram que BCGs recombinantes permanecem estáveis e expressando continuamente o gene inserido mesmo no ambiente intracelular de macrófagos (Medeiros 2001, Argondizzo 2005).

Recentemente Chabalgoity e colaboradores (2007) descrevem a importância da indução de citocinas para o desenvolvimento de uma resposta protetora para o desenho de vacinas. Visando obter dados preliminares que permitam demonstrar a viabilidade da seleção *in vitro* de vacinas, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar a possibilidade de se determinar o perfil de citocinas induzidas por protótipos vacinais em linhagem de células humanas.

As citocinas são consistentemente avaliadas e quantificadas durante testes pré-clínicos e clínicos, como marcadores de ativação e/ou supressão da resposta

imune induzida pelos protótipos vacinais. Nessa conjuntura, foi realizada a análise das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α expressas pela infecção com protótipo vacinal BCG/*sm14*, com a amostra vacinal de BCG Pasteur e com a construção BCG/pAU5 em células THP-1. Para a detecção intracelular de citocinas em células, utilizamos a técnica de imunocitoquímica (Santiago 2003) e a técnica de citometria (Kallás 1999).

A produção de citocinas induzidas pelo BCG em células mononucleares periféricas humanas segue uma cinética (Sander *et al.* 1995) que varia de indivíduo para indivíduo e tende a ser mediada por um perfil Th1 nos primeiros 5 a 7 dias, regredindo e assumindo perfil Th2 posteriormente (9 a 12 dias após a infecção). Contudo, estes autores não diferenciaram a produção de IL-10 pelos monócitos/macrófagos e linfócitos T. Mas a detecção de IL-10 foi identificada somente após 10 dias de infecção, o que contradiz nossos resultados e os de Atkinson e colaboradores (2000). Uma possível explicação pode estar na metodologia utilizada, na utilização de células não estimuladas e na obtenção destas células de indivíduos não expostos a micobactérias ou não vacinados pelo BCG. Sander e colaboradores (1995) utilizaram a técnica de imunofluorescência indireta e observação microscópica, enquanto Atkinson e colaboradores (2000) utilizaram macrófagos derivados de monócitos humanos. Em nosso sistema, a secreção de IL-10 é evidenciada em células THP-1 sem prévia ativação após 4 horas de incubação, da mesma forma após 24 horas observamos resultados similares aos descritos por Atkinson e colaboradores (2000) em macrófagos derivados de monócitos (*Monocyte-derived macrophage* – MDM). De modo interessante estes autores evidenciaram uma grande variabilidade na secreção de citocinas por MDM humanos, neste caso variando de 1,0 a 7,0% de células positivas para IL-10 após 20 horas de infecção. Observamos uma diferença entre nossos resultados obtidos pelas duas técnicas (imunocitoquímica e citometria), variando de 6,4% a 11,4%, respectivamente.

Quanto a secreção de IL-12 evidenciamos que as células THP-1 produzem, mesmo sem estímulos valores entre 2,7% e 8,8%, contudo Ciabattini e colaboradores (2006) descrevem a expressão de níveis basais de IL-12 em células mononucleares humanas (Ciabattini *et al.* 2006; 1 a 3%). O perfil de expressão de IL-12 expresso pelas células THP-1 não pode ser claramente identificado pela discrepância entre as duas metodologias utilizadas por nós, ou seja, a técnica de imunocitoquímica mostrou que 8,8% das células expressavam IL-12, enquanto que por citometria identificamos 2,7% de células positivas. Contudo após infecção pelo BCG foi observado um percentual que variou de 4,6% a 6,5% após 24 horas e 6,1 a

12,0% após 48 horas, indicando um aumento progressivo de células produtoras de IL-12. A infecção pelo BCG/sm14 também foi capaz de induzir percentuais semelhantes de células produtoras de IL-12.

Independente da metodologia utilizada, as infecções por BCG e BCG/sm14 induziram um percentual ligeiramente maior de células expressando IL-10 do que IL-12. Este perfil parece ser característico das células THP-1, e a infecção com BCG/sm14 não foi capaz de modificar esse perfil.

Uma análise mais longa, estudando a associação entre o BCG e as células THP-1 pode responder se a indução tardia destas citocinas pode ser modificada, visto não termos evidenciado esta mudança em culturas de até dois dias de interação.

Uma das maiores dificuldades para o desenvolvimento de uma vacina contra esquistossomose está a complexidade da interação entre patógeno e hospedeiro. As cercárias, os vermes adultos e os diferentes estágios de desenvolvimento entre estas formas apresentam mecanismos que permitem a estes evadir de uma resposta imune efetiva, incluindo a produção de moléculas antiinflamatórias, a inibição da migração de células apresentadoras de antígeno e a cobertura da superfície do parasito com moléculas do hospedeiro (Lebens *et al.* 2004). Outro ponto importante é o pouco entendimento da natureza da resposta imune protetora (Wynn & Hoffmann 2000, Pearce & McDonald 2002, Lebens *et al.* 2004).

Alguns autores demonstraram que em modelo murino e humano, a resposta Th2 seria eficaz para o controle da doença, ao passo que estudos de vacinação em camundongos indicam que uma imunidade mediada por células T, envolvendo a produção de IFN- γ e IL-12 (Th1), poderia ser melhor (Capron *et al.* 1995, Wynn & Hoffmann 2000). No entanto, a questão da resposta imune efetiva contra esquistossomose ainda é bastante polêmica. Existem autores que acreditam ser a resposta imune humoral a mais eficaz para a proteção de humanos e outros defendem a resposta imune celular, mas existem, também, aqueles que acreditam que ambas as respostas humoral e celular são imprescindíveis para a proteção (Brito *et al.* 2000, Ribeiro de Jesus *et al.* 2000, Varaldo *et al.* 2004). Estudos imunológicos em pessoas residentes em zonas endêmicas para esquistossomose, demonstraram altos níveis de IgE e IFN- γ , sugerindo a participação das respostas celular e humoral nos mecanismos imunológicos de resistência natural a reinfeção de *S. mansoni* (Ribeiro de Jesus *et al.* 2000). O estudo realizado por Brito e colaboradores (2000) na avaliação das respostas imunes frente à proteína Sm14 em

grupos de pessoas residentes em zonas endêmicas de esquistossomose e de pacientes crônicos e tratados para a doença, em relação à avaliação das citocinas produzidas, os níveis de IL-5 e IL-10, conhecidas como citocinas Th2, não foram estatisticamente diferentes em nenhum dos grupos estudados. Já o IFN- γ e TNF- α foram produzidos em quantidades significativamente maiores pelas PBMC de indivíduos normais endêmicos. Adicionalmente demonstraram que a IL-10 é uma importante citocina moduladora de respostas de células T na esquistossomose crônica, enquanto que a proliferação de linfócitos no grupo resistente não infectado é dependente de IFN- γ . Estes resultados sugerem que a resposta imune do tipo Th1 induzida em indivíduos normais endêmicos para um antígeno de esquistossomo poderia estar associada com resistência à infecção e também destacou a importância da Sm14 como potencial candidato vacinal contra esquistossomose humana (Brito *et al.* 2000).

Uma possível justificativa para nossos resultados seria o fato da proteína Sm14 ser expressa no citoplasma do BCG aliado a persistência intracelular BCG/*sm14* em células THP-1, não estando assim, disponível para a estimulação dos macrófagos. Nesse caso a apresentação do antígeno de interesse (Sm14) só acontece quando a Sm14 é liberada do fagossomo após a destruição do BCG (Kaufmann & Hess 1999). Dados obtidos por Varaldo e colaboradores (2004) e Argondizzo (2005), demonstram que não foram detectados anticorpos anti-Sm14 em camundongos imunizados com cepas recombinantes de BCG/*sm14*. Todavia vários autores já demonstraram, não somente a expressão de diversos antígenos no citoplasma de BCG recombinantes, como também conseguiram induzir uma eficiente resposta imune humoral, independente do sistema de apresentação no qual o antígeno alvo estava sendo expresso (Aldovini & Young 1991, Murray *et al.* 1992, Stover *et al.* 1991, Kremer *et al.* 1998, Hayward *et al.* 1999; da Cruz *et al.* 2002).

Os resultados obtidos não foram capazes de diferenciar o protótipo vacinal BCG/*sm14*, da amostra vacinal BCG Pasteur e da construção BCG/pAU5, não servindo, portanto, como comparativo aos trabalhos descritos para a determinação do perfil de citocinas obtidas nas respostas imunes contra o BCG e contra a proteína Sm14.

6. CONCLUSÕES

- Desenvolveu-se um protocolo de infecção com BCGs em células THP-1, determinando que a melhor relação foi de 10 BCGs para cada célula THP-1.
- A expressão da proteína recombinante Sm14 sintetizada pelos clones de BCG/*sm14* demonstrou-se satisfatória para realização dos experimentos de infecção em células THP-1
- O protótipo vacinal BCG/*sm14* manteve o mesmo grau de infecciosidade e persistência intracelular da sub-cepa vacinal BCG Pasteur.
- O protótipo vacinal BCG/*sm14* manteve a mesma capacidade de induzir a diferenciação e a maturação de macrófagos provenientes da linhagem de monócitos THP-1 que a sub-cepa vacinal BCG Pasteur.
- O protótipo vacinal BCG/*sm14* não foi capaz de modificar o perfil de IL-10, IL-12 e TNF- α induzido pela sub-cepa vacinal BCG Pasteur em células THP-1

7. PERSPECTIVAS

- Como a indução da resposta imune ao *Schistosoma mansoni* é preferencialmente induzida por resposta Th2 (aumento de IL-10 e diminuição de IL-12, IFN- γ e IL-2), a utilização do recombinante BCG/*sm14* como protótipo vacinal pode ser de relevância para a indução de resposta protetora para a esquistossomose, como para a tuberculose, visto que não houve diferença marcante na produção de IL-10 e/ou IL-12.
- Novos experimentos devem ser realizados para determinar o papel das células apresentadoras de antígenos na modulação de células T CD4 e CD8 visando um melhor entendimento da resposta imune adaptativa e de memória.
- A modulação das células apresentadoras de antígenos (monócitos, macrófagos, células dendríticas) pode direcionar a resposta imune a protótipos vacinais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK & Lichtman AH. **Imunologia celular e molecular**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005a. Cap.11: Citocinas. p. 251–282.

_____. **Imunologia celular e molecular**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005b. Cap.12: Imunidade inata. p. 283–306.

Ada G. The immunology of vaccination. In: Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines**. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2004. p. 31–46

_____. **Vaccines and vaccination**. N Engl J Med. 2001; 345 (14): 1042–1053

Al-Sherbiny M, Osman A, Barakat R, El Morshedy H, Bergquist R, Olds R. **In vitro cellular and humoral responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens**. Acta Trop. 2003; 88 (2): 117-130.

Aldovini A & Young RA. **Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-mv vaccines**. Nature. 1991; 351: 479–482

Amadori M, Ritelli M, Tagliabue S, Pacciarini ML. **Macrophage cell cultures for rapid isolation of intracellular bacteria: the *Mycobacterium bovis* model**. Methods Mol Biol. 2006; 345: 203–217

André FE. **Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises**. Vaccine 2003; 21: 593–595.

Argondizzo APC. **Construção do *M. bovis* BGC recombinante Sm14r e Avaliação da sua Capacidade Protetora contra Esquistossomose no Modelo Murino**. Rio de Janeiro; 2005. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] – FIOCRUZ

ATCC – *American type culture collection* **THP-1 Catalog Details: TIB-202** [online]. Manassas, EUA. 2006. [capturado em 10 de setembro de 2006]. Disponível em: <http://www.atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=TIB-202>

Atkinson S, Valadas E, Smith SM, Lukey PT, Dockrell HM. **Monocyte-derived macrophage cytokine responses induced by *M. bovis* BCG**. Tuber Lung Dis. 2000; 80 (4-5):197-207. Erratum in: Tuber Lung Dis 2000; 80 (6): 293.

Auwerx J. **The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation**. Experimentia. 1991; 47: 22–31.

Balls M. **Future Improvements: replacement *in vitro* methods**. ILAR J. 2002; 43 (Suppl): S69–S73

Bastos K.RB, Alvarez JM, Marinho CRF, Rizzo LV, D'Império Lima MR. **Macrophages from IL-12p40-deficient mice have a bias toward the M2 activation profile**. J. Leukoc. Biol. 2002; 71: 271–278

Bennett S, Por SB, Cooley MA, Breit SN. ***In vitro* replication dynamics of human culture-derived macrophages in a long term serum-free system**. J Immunol. 1993; 150 (6): 2364–2371

Berges C, Naujokat C, Tinapp S, Wieczorek H, Hoh A, Sadeghi M, Opelz G, Daniel V. **A cell line model for the differentiation of human dendritic cells.** Biochem Biophys Res Commun. 2005; 333 (3): 896–907

Beverley PCL. **Immunology of vaccination.** Br Med Bull. 2002; 62: 15-28

Bonah C. **The 'experimental stable' of the BCG vaccine: safety, efficacy, proof, and standards, 1921-1933.** Stud Hist Philos Biol Biomed Sci. 2005; 36(4): 696–721

Brito CF, Caldas IR, Coura Filho P, Correa-Oliveira R, Oliveira SC. **CD4+ T cells of schistosomiasis naturally resistant individuals living in an endemic area produce interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha in response to the recombinant 14KDA *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein.** Scand J Immunol. 2000; 51 (6): 595–601

Brusic V, August JT & Petrovsky N. **Information technologies for vaccine research.** Expert Rev Vaccines. 2005; 4 (3): 407–417

Campbell D, Mann BJ & Chadee K. **A subunit vaccine candidate region of the *Entamoeba histolytica* galactose-adherence lectin promotes interleukin-12 gene transcription and protein production in human macrophages.** Eur J Immunol. 2000; 30 (2): 423-30.

Capron A, Riveau G, Grzych JM, Boulanger D, Capron M, Pierce R. **Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomes: background and update.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 1995; 90 (2): 235–240

Carrel A. **On the permanent life of tissues outside the organism.** J. Exp. Med. 1912, 15: 516 – 528 *apud* Freshney RI. Introduction to basic principles. In: Masters JRW. **Animal cell culture: a practical approach.** 3rd ed. Oxford: Oxford University Press. 2000b: 1-18.

Chabalgoity JA, Baz A, Rial A, Grille S. **The relevance of cytokines for development of protective immunity and rational design of vaccines.** Cytokine Growth Factor Rev. 2007; 18 (1-2): 195–207

Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. **The global status of schistosomiasis and its control.** Acta Trop. 2000; 77 (1): 41–51

Ciabattini A, Cuppone AM, Pulimeno R, Iannelli F, Pozzi G, Medaglini D. **Stimulation of human monocytes with the gram-positive vaccine vector *Streptococcus gordonii*.** Clin Vaccine Immunol. 2006; 13 (9): 1037-43.

Clingan JM, Yanagawa Y, Iwabuchi K, Onoé K. **Effect of T helper 1 (Th1) / Th2 cytokine on chemokine-induced dendritic cell functions.** Cell Immunol. 2006; 242: 72–79.

Costa-Carvalho BT & Sole D. Bases Imunológicas. In: Farhat CK, Carvalho ES, Weckx LY, Carvalho LHFR, Succi RCM, org. **Imunizações: fundamentos e prática** 4^a ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2000. p. 19–36.

da Cruz FW, McBride AJA, Conceição FR, Dale JW, McFadden J, Dellagostin OA. **Expression of the B-cell and T-cell epitopes of the rabies virus nucleoprotein in *Mycobacterium bovis* BCG and induction of an humoral response in mice.** *Vaccine*. 2002; 20: 731–736

Dai W, Gao H, Huang H, Yuan Y, Hu J, Huangfu Y. **Comparative study on the immunogenicity between recombinant MS-Sj26GST vaccine and recombinant BCG-Sj26GST vaccine in *Schistosoma japonicum*.** *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2003, 23 (3): 213–5

Dellepiane N, Griffiths E & Milstien JB. **New challenges in assuring vaccine quality.** *Bull World Health Organ*. 2000; 78 (2): 155–62

Di Marzo P, Puddu P, Conti L, Belardelli F, Gesani S. **Interferon- γ up-regulates its own gene expression in mouse peritoneal macrophages.** *J Exp Med*. 1994; 179: 1731-1736.

Diaz-Silvestre H, Espinosa-Cueto P, Sanchez-Gonzalez A, Esparza-Ceron MA, Pereira-Suarez AL, Bernal-Fernandez G, Espitia C, Mancilla R. **The 19-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a major adhesin that binds the mannose receptor of THP-1 monocytic cells and promotes phagocytosis of mycobacteria.** *Microb Pathog*. 2005; 39 (3): 97–107

Doyle A & Griffiths JB. **Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology.** West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 1998. Cap.1 The cell: Selection and standardization. p. 3–52

Ellis RW. Technologies for making new vaccines. **In:** Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines**. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2004. p. 1177–1198

Esser MT, Marchese RD, Kierstead LS, Tussey LG, Wang F, Chirmule N, Washabaugh MW. **Memory T cells and vaccines.** *Vaccine*. 2003, 21 (5-6): 419–430

Fantuzzi L, Puddu P, Varano B, Del Corno M, Belardelli F, Gessani S. **IFN-alpha and IL-18 exert opposite regulatory effects on the IL-12 receptor expression and IL-12-induced IFN-gamma production in mouse macrophages: novel pathways in the regulation of the inflammatory response of macrophages.** *J Leukoc Biol*. 2000; 68: 707-714.

FDA – *Food and drug administration*.. **Guidance for industry: Characterization and qualification of cell substrates and other biological starting materials used in the production of viral vaccines for the prevention and treatment of infectious disease.** [online]. Rockville: 2006. [capturado em 10 de janeiro de 2007]. Disponível em: <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>.

Fernandes ATG. **Identificação de células citotóxicas presentes no processo inflamatório uterino durante a co-infecção pelo vírus da imunodeficiência humana HIV e pelo vírus do papiloma humano HPV.** Rio de Janeiro. 2003. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] Fiocruz.

Freshney RI. Introduction to basic principles. In: Masters JRW, org. **Animal cell culture: a practical approach**. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press. 2000a. p. 1–18

_____. **Culture of animal cells: a manual of basic techniques**. 4th ed. New York: Wiley-Liss Inc. 2000b. Cap.1: Introduction. p. 1–8

Guermontprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. **Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells**. Annu Rev Immunol. 2002; 20: 621-67.

Haeseleer F. **Structural instability of recombinant plasmids in mycobacteria**. Res Microbiol. 1994; 145: 683–687

Harrison RG. **Observations on the living developing nerve fiber**. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1910, 140: 1905 – 7 *apud* Freshney RI. Introduction to basic principles. In: Masters JRW, org. **Animal cell culture: a practical approach**. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press. 2000b. p. 1-18.

Hasan Z, Ashraf M, Tayyebi A, Hussain R. **M. leprae inhibits apoptosis in THP-1 cells by downregulation of Bad and Bak and upregulation of Mcl-1 gene expression**. BMC Microbiol. 2006; 6: 1-9.

Hayward CMM, O'Gaora P, Young DB, Griffin GE, Thole J, Hirst TR, Castello-Branco LR, Lewis DJM. **Construction and murine immunogenicity of recombinant Bacille Calmette Guérin vaccines expressing the B subunit of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin**. Vaccine. 1999, 17: 1272–1281.

Hendriksen CFM. **Laboratory animals and immunization procedures: challenges and opportunities**. ILIAR J. 2005; 46 (3): 227–229.

Henriques MGMO & Sampaio ALF. Alternativas para animais de laboratório: sistemas *in vitro*. In: Andrade A, Pinto SC & Oliveira RS, org. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002: 337–344

Kallás EG. **Detecção da produção antígeno-específica de IFN γ e IL-4 por linfócitos T de sangue periférico após infecção e vacinação**. São Paulo 1999. Doutorado [Escola Paulista de Medicina] Universidade Federal de São Paulo

Kaufmann SHE & Flynn JL. CD8 T cells in tuberculosis. In: Cole ST, Eisenach D, McMurray DN, Jacobs Jr WR, org. **Tuberculosis and the tubercle bacillus**. Washington: ASM Press. 2005. p. 155–164.

Kaufmann SH & Hess J. **Impact of intracellular location of and antigen display by intracellular bacteria: implications for vaccine development**. Immunol Lett. 1999; 65 (1-2): 81–4

Kidd P. **Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease**. Altern Med Rev. 2003; 8 (3): 223-246.

Kremer L, Dupre L, Riveau G, Capron A, Loch C. **Systemic and mucosal immune responses after intranasal administration of recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin expressing glutathione S-transferase from *Schistosoma haematobium*.** Infect Immun. 1998; 66 (12): 5669-5676.

Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, Graeber TG, Sieling PA, Liu YJ, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. **TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells.** Nat Med. 2005, 11 (6): 653–660

Laemmli UK. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature. 1970, 227: 680-685

Larsen NG. **Drug and Device Development Guide.** Copenhagen: Medicon Valley Academy. 2005. Cap. 1: Development – definition, costs and time. p. 9-13

Lebens M, Su J, Czerkinsky C, Holmgren J. **Current status and future prospects for a vaccine against schistosomiasis.** Expert Rev Vaccines. 2004; 3 (3): 315-328.

Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, Sherman DR. **Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation.** J Infect Dis. 2003; 187 (1): 117–123

MacCullough KC & Summerfield A. **Basic concepts of immune response and defense development.** ILAR J. 2005; 46 (3): 230–240.

Mantovani A, Sica A & Locati M. **Macrophage polarization comes of age.** Immunity. 2005; 23 (4): 344 – 346

MacFarland J. **Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines.** J Am Med Assoc. 1907; 14: 1176-1178

Medeiros MA. **Desenvolvimento do *Mycobacterium bovis* BCG como sistema de expressão de antígeno vacinal de *Bordetella pertussis*.** Pelotas; 2001. Doutorado – Universidade Federal de Pelotas.

Medeiros MA, Armoa GR, Dellagostin AO, McIntosh D. **Induction of humoral immunity in response to immunization with recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the S1 subunit of *Bordetella pertussis* toxin.** Can. J. Microbiol. 2005; 51 (12): 1015 - 20.

Metz B, Hendriksen CFM, Jiskoot W, Kersten GFA. **Reduction of animal use in vaccine quality control: opportunities and problems.** Vaccine. 2002, 20: 2411 – 2430

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Annette MH. **M1/M2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm.** J Immunol. 2000; 164: 6166-6173.

Misumi S, Endo M, Mukai R, Tachibana K, Umeda M, Honda T, Takamune N, Shoji S. **A novel cyclic peptide immunization strategy for preventing HIV-1/AIDS infection and progression.** J Biol Chem. 2003; 278 (34): 32335-43.

- Mosmann TR. **Cytokines: is there biological meaning?** Curr. Opin Immunol. 1991, 3: 311-314
- Mosmann TR & Coffman RL. **Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells.** Adv. Immunol. 1989, 46: 111-147
- Murray A, Winter N, Lagranderie M, Hill DF, Rauzier J, Timm J, Leclerc C, Moriaty KM, Gheorghiu M, Gicquel B. **Expression of *Escherichia coli* beta-galactosidase in *Mycobacterium bovis* BCG using an expression system isolated from *Mycobacterium paratuberculosis* which induced humoral and cellular immune responses.** Mol Microbiol. 1992, 6 (22): 3331-3342.
- NIAID - *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*. **Understand vaccines: What they are / How they work.** Washington: NIH publication, 2003. 55 pp.
- Ohara N & Yamada T. **Recombinant BCG vaccines.** Vaccine. 2001, 19: 4089–4098
- Oliveira MM, Charlab R, Pessolani MC. ***Mycobacterium bovis* BCG but not *Mycobacterium leprae* induces TNF-alpha secretion in human monocytic THP-1 cells.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96 (7): 973-978.
- Parlow TG. A resposta imunológica. In: Parlow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB, org. **Imunologia médica.** 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004. p. 52-60.
- Pearce EJ & McDonald AS. **The immunobiology of schistosomiasis.** Nat Rev Immunol. 2002; 2 (7):499-511.
- Plotkin SA. **Six revolutions in vaccinology.** Pediatr Infect Dis J. 2005a, 24 (1): 1–9
- _____. **Vaccines: past, present and future.** Nat Med. 2005b, 11 (4 Suppl): S5-S11.
- Plotkin SL & Plotkin SA. A short history of vaccination. In: Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines.** 4th ed. Philadelphia: Saunders, 2004: 1-12
- Presgrave OAF. **Teste de liberação de citocinas como método alternativo ao ensaio de pirogênio em coelhos no controle da qualidade de produtos injetáveis.** Rio de Janeiro; 2003. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] - Fundação Oswaldo Cruz
- Presgrave OAF. Alternativas para animais de laboratório: do animal ao computador. In: Andrade A, Pinto SC & Oliveira RS, org. **Animais de laboratório: criação e experimentação.** Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002. p. 361–368
- Rappuoli R. **From Pasteur to genomics: progress and challenges in infectious diseases.** Nat Med. 2004, 10 (11): 1177–1185
- Reis e Sousa C. **Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity.** Curr Opin Immunol. 2004a, 16 (1): 21–5

_____. **Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls.** *Semin Immunol.* 2004b, 16 (1): 27–34

Rezende CA, De Moraes MT, de Souza Matos DC, McIntoch D, Armoa GR. **Humoral response and genetic stability of recombinant BCG expressing hepatitis B surface antigens.** *J Virol Methods* 2005; 125 (1): 1–9.

Ribeiro de Jesus A, Araújo I, Bacellar O, Magalhães A, Pearce E, Harn D, Strand M, Carvalho EM. **Human immune responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens.** *Infect Immun.* 2000; 68 (5): 2797–803

Ritelli M, Amadori M, Tagliabue S, Pacciarini ML. **Use of a macrophage cell line for rapid detection of *Mycobacterium bovis* in diagnostic samples.** *Vet Microbiol.* 2003; 94: 105-120.

Rosenthal KS & Zimmerman DH. **Vaccines: All things considered.** *Clin Vaccine Immunol.* 2006; 13 (8): 821-829

Russell WMS. & Burch RL. **The Principles of Humane Experimental Technique.** London: Methuen. Smyth, D. 1959. 238 pp.

Saalmüller A. **New understanding of immunological mechanisms.** *Vet Microbiol.* 2006; 117 (1): 32-8.

Sander B. Skansén-Saphir, Damm O, Hakansson L, Andersson J, Andersson U. **Sequential production of Th1 and Th2 cytokines in response to live bacillus Calmette-Guerin.** *Immunology.* 1995, 86 (4): 512–8

Santiago ACC. **Correlação entre a colonização pelos isolados clínicos de *Mycobacterium avium* e a imunidade celular específica a antígenos micobacterianos em pacientes HIV-1 positivos.** Rio de Janeiro 2003. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] FIOCRUZ.

Santos JPS. **Avaliação da estabilidade estrutural e funcional de vetores plasmidiais recombinantes bifuncionais (*Escherichia coli* – *Mycobacterium*) em *Mycobacterium bovis* BCG.** Rio de Janeiro; 2002. Mestrado [Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes] – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Serruto D & Rappuoli R. **Post-genomic vaccine development.** *FEBS Lett.* 2006, 580: 2985–2992.

SLIPE – Sociedade Latinoamericana de Infectologia Pediátrica & API – Associação Panamericana de Infectologia. **Manual de Vacinas da América Latina.** Madrid: Euro RSCG Life Esquema, 2005. 620 pp.

Smith KC & Starke JR. Bacille Calmette-Guérin vaccine. In: Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines.** 4ª ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2004 p. 179–210

Smith SG, Patel PM, Selby PJ, Jackson AM. **The response of human dendritic cells to recombinant adenovirus, recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus**

Calmette Guerin and biolistic methods of antigen delivery: different induction of contact-dependant and soluble signals. Immunol Lett. 2001; 76 (2): 79-88.

Standiford TJ. **Anti-inflammatory cytokines and cytokine antagonists.** Curr Pharm Des. 2000, 6 (6): 633-49.

Stokes RW & Doxsee D. **The receptor-mediated uptake, survival, replication, and drug sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* within the Macrophage-like cell line THP-1: A comparison with human monocyte-derived macrophages.** Cell Immunol. 1999; 197: 1-9

Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, Bennett LT, Bansal GP, Young JF, Lee MH, Hatfull GF, Snapper SR, Barletta RG, Jacobs WR, Bloom RR. **New use of BCG for recombinant vaccines.** Nature. 1991, 351: 456-460.

Takahashi H. **Antigen presentation in vaccine development.** Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2003, 26 (5-6): 309–28

Tendler M, Brito CA, Vilar MM, Serra-Freire N, Diogo CM, Almeida MS, Delbem ACB, Silva JF, Savino W, Garrat RC, Katz N, Simpson AJG. **A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine.** Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93: 269–273

Theus SA, Cave MD & Eisenach KD. **Activated THP-1 cells: an attractive model for the assessment of intracellular growth rates of *Mycobacterium tuberculosis* isolates.** Infect Immun. 2004; 72(2): 1169-1173

_____. **Intracellular macrophage growth rates and cytokine profiles of *Mycobacterium tuberculosis* strains with different transmission dynamics.** Infect Dis. 2005; 191 (3): 453–60

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. **Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1).** Int. J. Cancer. 1980; 26: 171-176

Varaldo PB, Leite LCC, Dias WO, Miyaji EN, Torres FIG, Gebara VC, Armôa GRG, Campos AS, Matos DCS, Winter N, Gicquel B, Vilar MM, McFadden J, Almeida MS, Tendler M, McIntosh D. **Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* protects mice from cercarial challenge.** Infect Immun. 2004; 72(6): 3336-3343

Varaldo PB, Miyaji EN, Vilar MM, Campos AS, Dias WO, Armôa GRG, Tendler M, Leite LCC, McIntosh D. **Mycobacterial codon optimization of the gene encoding the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* in recombinant *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin enhances protein expression but not protection against cercarial challenge in mice.** FEMS Immunol Med Microbiol. 2006, 48 (1): 132-139.

Wack A & Rappuoli R. **Vaccinology at the beginning of the 21st century.** Curr Opin Immunol. 2005, 17 (4): 411– 418

WHO. *World health organization*. **TDR Progress: New and Improved Tools - New candidates in development: vaccine development schistosomiasis**. Geneva: 2000. [capturado em 16 de outubro de 2004]. Disponível em: <http://who.int/tdr/research/progress9900/tools/vaccine-schistossomiasis.htm>.

_____. **Global Plan to stop tuberculosis 2006-2015**. Geneva: WHO Press. 2006: 1-17

Wynn TA & Hoffmann KF. **Defining a schistosomiasis vaccination strategy – it is really Th1 versus Th2?** *Parasitol Today*. 2000; 16, (11): 497–501.

Xia HH, Lam SK, Chan AO, Lin MC, Kung HF, Ogura K, Berg DE, Wong BC. **Macrophage migration inhibitory factor stimulated by *Helicobacter pylori* increases proliferation of gastric epithelial cells**. *World J Gastroenterol*. 2005, 11 (13): 1946–1950

Xing Z, Zganiacz A & Santosuosso M. **Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF-alpha and nitric oxide from macrophages via IFN-gamma induction**. *J Leukoc Biol*. 2000; 68: 897-902.

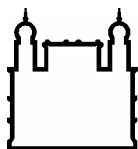
Zhao G, Etherton TD, Martin KR, Vanden Heuvel JP, Gillies PJ, West SG, Kris-Etherton PM. **Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells**. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 336 (3): 909–917.

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE AVALIAÇÃO DE
PROTÓTIPOS VACINAIS EM LINHAGEM DE MONÓCITO HUMANA
(THP-1)**

DANILO PARMERA

RIO DE JANEIRO
2007



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

DANILO PARMERA

**Desenvolvimento de um modelo de avaliação de protótipos
vacinais em linhagem de monócito humana (THP-1)**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos

RIO DE JANEIRO
2007

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas / ICICT / FIOCRUZ - RJ

P253 Parmera, Danilo

Desenvolvimento de um modelo de avaliação de protótipos vacinais em
linhagem de monócito humana (THP-1) / Danilo Parmera. – Rio de Janeiro,
2007.

xiii, 64 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos,
Tecnologia em Imunobiológicos, 2007.

Bibliografia: f. 56-64.

1. THP-1. 2. Vacina BCG. 3. Sm-14. 4. Vacina – Protótipo. 5. Citocinas.
I. Título.

CDD: 615.372

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico, Laboratório de Tecnologia Recombinate e no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Departamento de Micro-Imuno e Parasitologia, Serviço de Imunologia, Laboratório de Imunologia Celular, sob a orientação do Prof. Dr. Geraldo Rodrigues Garcia Armoa e Prof Dra. Maria da Glória Bonecini de Almeida.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

DANILO PARMERA

**Desenvolvimento de um modelo de avaliação de protótipos
vacinais em linhagem de monócito humana (THP-1)**

ORIENTADORES: Prof. Dr. Geraldo Rodrigues Garcia Armôa
Profª. Drª. Maria da Glória Bonecini de Almeida

Examinadores:

Prof. Dr. Douglas McIntosh – Bio-Manguinhos – Presidente

Profª. Drª. Cynthia Silveira Horn – IPEC/FIOCRUZ

Prof. Dr. Walter Martin Roland Oelemann – IMPPG/UFRJ

Rio de Janeiro

Dedico esta Dissertação a Deus,

pele dom da vida.

a minha família

pele carinho e apoio na minha trajetória,

à minha noiva, Fernanda,

pele amor.

AGRADECIMENTOS

À FIOCRUZ, em nome de seu presidente Dr. Paulo Marchiori Buss, por proporcionar a excelência na produção de fármacos e imunobiológicos e no desenvolvimento científico de nosso país.

À Bio-Manguinhos, em nome do seu diretor Dr. Akira Homma, pela oportunidade e condições propiciadas à realização de uma pós-graduação profissional.

Ao IPEC, em nome da sua diretora Dra. Valdiléa Gonçalves Veloso, pelas condições propiciadas à realização da minha dissertação.

Ao orientador e amigo Prof. Dr. Geraldo Rodrigues Garcia Armôa por acreditar no meu potencial, pelos valorosos ensinamentos, apoio incondicional e incentivo aos trabalhos realizados.

À orientadora e amiga Prof^a. Dr^a. Maria da Glória Bonecini de Almeida pelas portas abertas de seu laboratório, possibilitando a execução deste trabalho e pela sincera atenção com que sempre me recebeu e pelo exemplo de pesquisadora.

Aos Professores, Coordenadora e Secretária do MPTI, que muito contribuíram na minha valorização humana e aos meios acadêmicos para ingresso, manutenção e término do curso.

À Dr^a. Cynthia Silveira Horn, pelas importantes contribuições durante a realização deste trabalho, em especial o experimento de proliferação celular.

Ao Dr. Douglas MacIntosh, pelas importantes contribuições durante a realização deste trabalho, em especial no auxílio na realização dos ensaios de *western blotting*, no cultivo das amostras de BCG e na revisão deste manuscrito.

Aos amigos Ana Paula Argondizzo, João Pedro Souza Santos, Gabriela dos Santos Esteves, Dilzamar Velloso do Nascimento, Dr. José Procópio Senna, Dr. Marco Antônio Medeiros, Natália Plínio dos Santos, Dra. Elezer Monte Blanco Lemes, Camilla Bayma, Dra. Ana Carolina Góes pelo companheirismo, amizade, solidariedade e apoio pessoal e profissional.

À amiga Maria Luiza Azevedo pela amizade, eficiência, disponibilidade de auxílio em todos os momentos e palavras reconfortantes nos momentos de desespero.

À doutoranda e amiga Ana Teresa Fernandes pela alegria e disposição no auxílio dos experimentos de imunocitoquímica

Aos tecnologistas e amigos Andréia Lamoglia e Márcio Mantuano pelo auxílio na realização dos experimentos realizados no citômetro de fluxo.

À amiga Larissa Catharina Costa pela colaboração e dedicação nos experimentos infinitos e pelos momentos divertidos no laboratório.

Ao amigo Dyego Carletti pelo auxílio no experimento de proliferação celular.

Aos colaboradores e amigos do Serviço de Imunologia, Dra. Liane Castro, Carla Bial, Márcia Andrade, Millena Rosalba, Ana Cristina Santiago Leandro, Marcelo Leandro, Leonardo Gatto, Silvia Silva, Regina Pimenta, Maristela Lima, Monique Lima e a equipe do laboratório de Imunodiagnóstico pelo companheirismo e apoio.

Aos companheiros do Mestrado Profissional, no qual dividimos boa parte de nossas manhãs, pela cooperação e companheirismo.

Aos parentes e amigos pelos momentos de descontração, conversas, apoio, amizade, alegrias e tristezas compartilhadas. (por serem muitos não serão citados, mas estarão sempre em minha memória)

A todas as pessoas que não foram nominalmente mencionadas, mas que contribuíram para viabilizar este trabalho.

E, finalmente, a Deus, que proporcionou a mim e a minha família os meios possíveis para alcançar a felicidade.

"ESPERE O MELHOR, PREPARE-SE PARA O PIOR E ACEITE O QUE VIER."

Provérbio Chinês

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	lx
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3. METODOLOGIA.....	15
3.1 Cultivo da célula THP-1.....	15
3.2. Cultivo das cepas de BCG.....	16
3.3 Avaliação da expressão da proteína recombinante Sm14 em BCG/ <i>sm14</i>	17
3.4 Padronização da multiplicidade de infecção (MOI) do BCG-P.....	18
3.5 Infecção com BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles em células THP-1.....	19
3.6 Avaliação da capacidade de proliferação celular da célula THP-1.....	19
3.7 Avaliação da estabilidade funcional (expressão do gene <i>kanR</i>) do vetor de expressão pAU5 dos BCGr.....	20
3.8 Protocolo de imunocitoquímica para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1.....	20
3.9 Protocolo de citometria de fluxo para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1.....	22
4. RESULTADOS.....	24
4.1 Cultivo da célula THP-1.....	24
4.1.1 Meios de cultivo.....	24
4.1.2 Manutenção.....	24
4.2. Cultivo das cepas de BCG.....	25
4.3 Expressão da proteína Sm14 pelo BCG/ <i>sm14</i>	26
4.4 Multiplicidade de infecção (MOI) BCG:THP-1	26

4.5 Capacidade de proliferação da célula THP-1 infectada pelo BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles.....	29
4.6 Avaliação da viabilidade e estabilidade funcional (expressão do gene <i>kanR</i>) do BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles recuperados de células THP-1	30
4.7. Avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles em células THP-1 por imunocitoquímica	31
4.8 Avaliação das citocinas a partir da infecção com BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles em células THP-1 por Citometria de Fluxo	34
4.9 Comparação entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo.....	39
4.9.1 Detecção de IL-10.....	39
4.9.2 Detecção de IL-12.....	41
4.9.3 Detecção de TNF- α	43
5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÕES	54
7. PERSPECTIVAS	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	grau Celsius
μCi	micro Curie
μL	Microlitro
μg	Micrograma
ADC	Albumina – Dextrose – Catalase
APC	<i>Antigen presenting cells</i> – célula apresentadora de antígenos
API	Associação Panamericana de Infectologia
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATLA	<i>Alternatives to Laboratory Animals</i>
BCG	<i>Mycobacterium bovis</i> Bacilo Calmette-Guérin
BCG-P	<i>M. bovis</i> Bacilo Calmette-Guérin sub-cepa Pasteur 1173P2
BCGr	<i>M. bovis</i> Bacilo Calmette-Guérin recombinante
BCG/pAU5	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepa Pasteur transformado o vetor de expressão pAU5
BCGr/pPL73-sm14	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepa Pasteur 1173P2 transformado com vetor de expressão pPL73 contendo o gene <i>sm14</i> de <i>S. mansoni</i>
BCG/sm14	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepa Pasteur 1173P2 transformado com o vetor de expressão pAU5 contendo o gene <i>sm14</i> de <i>S. mansoni</i>
Bio-Manguinhos	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
BP	<i>Band pass</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i> – grupo de diferenciação 4
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i> – grupo de diferenciação 8
cm ²	Centímetro quadrado
CMI	<i>Cell-mediated immunity</i> – Imunidade mediada por células
Com	Contagem por minuto
CO ₂	Gás carbônico
CpG	Dinucleotídeo formado pela ligação fosfodiéster de citosina com guanina na mesma fita de DNA
CTFA	<i>Cosmetic, Toiletries and Frangrance Association</i>

DAB	3-3' diaminobenzidina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> – Meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> – Ácido desoxirribonucleico
Dr(a).	Doutor(a)
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECVAM	<i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i>
EUA	Estados Unidos da América
FABP	<i>Fatty acid binding protein</i> - Proteína ligante a ácidos graxos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> – Isotiocianato de fluoresceína
FL	Análise de fluorescência (citometria de fluxo)
FRAME	<i>Fund for Replacement of Animal Medical Experiments</i>
FSC	<i>Foward angle light scatter</i>
g	Gramma
<i>g</i>	Aceleração gravitacional
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i> – Solução salina de Hank
HEPES	Acido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IFN	Interferon
IMPPG	Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
IRAG	<i>Interagency Regulatory Alternatives Group</i>
Kan	Canamicina
<i>KanR</i>	Gene de resistência à canamicina derivado do Tn903
kDa	Kilodaltons
LATER	Laboratório de Tecnologia Recombinante
log	Logaritmo
log ₁₀	Logaritmo na base 10
LPS	Lipopolissacarídeo

LSAB	<i>Labeled StreptAvidin Biotin</i>
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
M1	Macrófago tipo 1
M2	Macrófago tipo 2
MDM	<i>Monocyte-derived macrophage</i> – Macrófago derivado de monócito
MEM	<i>Minimum essential medium of Eagle</i> – Meio mínimo essencial de Eagle
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> - Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitro
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> – Multiplicidade de infecção
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Msc	Mestre
nº	Número
ng	Nanograma
NIAID	<i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i> - EUA
NK	<i>Natural killer cells</i> – Células matadoras naturais
nm	Nanômetro
O ₂	Gás oxigênio
OADC	Ácido oléico – Albumina – Dextrose – Catalase
<i>oriE</i>	Origem de replicação do bacteriófago T4 de <i>Escherichia coli</i>
<i>oriM</i>	Origem de replicação do plasmídeo pAL5000 de <i>Mycobacterium fortuitum</i>
PA	<i>pro analysis</i> - para análise
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> – Padrões moleculares associados ao patógeno
PAPES	Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde
pAU5	Vetor de expressão citoplasmático
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> - Células mononucleares do sangue periférico
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> - Salina tamponada de fosfato

PBS-T	<i>Phosphate-buffered saline Tween20</i> - Salina tamponada de fosfato com Tween20
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
PE	<i>Phycoerythrin</i> - Ficoeritrina
pH	Potencial hidrogenionico
<i>Phsp60*</i>	Promotor <i>hsp60</i> de <i>Mycobacterium bovis</i> BCG modificado
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
POPOP	p-bis[2(5-. feniloxazoil)]-benzeno
PPO	2,5-difeniloxazol
Prof(a)	Professor (a)
PRR	<i>Pattern-recognition receptors</i> – Receptores de reconhecimento padrão
R1	Região de análise (citometria de fluxo)
Reg	Registro
rpm	Rotação por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> – Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SFB	Soro fetal bovino
SLIPE	Sociedade Latinoamericana de Infectologia Pediátrica
Sm14	Proteína de <i>Schistosoma mansoni</i>
Sm14r	Proteína recombinante de <i>S. mansoni</i> expressa em <i>E. coli</i>
<i>sm14</i>	Gene de <i>S. mansoni</i>
SSC	<i>Side angle light scatter</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> – Salina tamponada de Tris
TBS-T	<i>Tris-buffered saline Tween 20</i> – Salina tamponada de Tris com Tween 20
Tc	<i>T cytotoxic cell</i> – Célula T citotóxica
TCR	<i>T cell receptor</i> – receptor de célula T
TDR	<i>Special programme for research and training in tropical disease</i>

TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i> - Fator transformador de crescimento beta
Th	<i>T helper cell</i>
Th1	<i>T helper cell type 1</i> – Célula T auxiliar tipo 1
Th2	<i>T helper cell type 2</i> – Célula T auxiliar tipo 2
Timidina-H ³	Timidina tritiada
TLR	<i>Toll like receptor</i> – Receptor do tipo Toll
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alfa</i> - Fator de necrose tumoral alfa
TPA	12-O-tetradecanolforbol-13-acetato
Treg	<i>T regulatory cell</i> – Célula T regulatória
UFC	Unidades formadoras de colônias por mililitro
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
v	Volume
WHO	<i>World Health Organization</i> – Organização Mundial da Saúde
x	Vezes

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Características das cepas de BCGs	16
Tabela 3.2: Anticorpos utilizados no protocolo de imunocitoquímica.....	21
Tabela 3.3: Anticorpos utilizados no protocolo de citometria de fluxo.....	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Visão esquemática da indução do sistema imune gerada por um patógeno ou uma vacina.....	08
Figura 1.2: Diagrama do modelo molecular da proteína Sm14.....	11
Figura 4.1: Microscopia óptica (200 x) de células THP-1, após três passagens, mantidas em meio RPMI 1640 preparado com 0,2% de NaHCO ₃ e suplementado com 10% de SFB.....	24
Figura 4.2: Cultura de <i>M. bovis</i> BCG Pasteur cultivado em meio 7H11 suplementado com 10% de OADC.....	25
Figura 4.3: Expressão da proteína Sm14 produzida pelos quatro clones de BCG/ <i>sm14</i> utilizados nos experimentos de infecção.....	26
Figura 4.4: Expressão de IL-10, IL-12 e TNF- α em células THP-1 infectadas com BCG-P.....	28
Figura 4.5: Atividade proliferativa das células THP-1 infectadas pelo BCG/ <i>sm14</i> e pelos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5)	29
Figura 4.6: Cinética da viabilidade do protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e dos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5) recuperados de células THP-1 e cultivados nos meios Middlebrook 7H11 7H11/Kan.....	31
Figura 4.7: Microscopia óptica (1000 x) de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após 24 horas de infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), detectadas por imunocitoquímica.....	32
Figura 4.8: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica.....	33
Figura 4.9: Determinação da região de análise das células THP-1 mantidas em cultivo celular.....	34

Figura 4.10: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 TNF- α e após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	35
Figura 4.11: Gráfico tamanho (FSC) <i>versus</i> fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	36
Figura 4.12: Gráfico tamanho (FSC) <i>versus</i> fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	37
Figura 4.13: Gráfico tamanho (FSC) <i>versus</i> fluorescência (FL1 ou FL2) da avaliação de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	38
Figura 4.14: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria de fluxo.....	40
Figura 4.15: Percentagem de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria.....	42
Figura 4.16: Percentagem de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria.....	44
Figura 5.1: Modelo esquemático das etapas necessárias para implantação de novos fármacos e imunobiológicos.....	47

RESUMO

As culturas de células vêm sendo utilizadas extensivamente no desenvolvimento e na produção de uma variedade de produtos terapêuticos e profiláticos, tornando-se uma ferramenta indispensável para geneticistas, imunologistas, vacinologistas e a indústria farmacêutica. A adoção de sistemas de ensaios celulares *in vitro* tem sido aplicada como um método alternativo para a substituição ou diminuição do uso de animais nas fases de desenvolvimento, produção e testes de vacinas, demonstrando resultados promissores. Da mesma forma, sistemas computacionais podem ampliar a utilização desta ferramenta para etapas do desenvolvimento de vacinas candidatas na fase pré-clínica. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um protocolo *in vitro* utilizando culturas de células humanas - a linhagem de monócitos THP-1, para a seleção de um protótipo vacinal - a cepa Pasteur de *Mycobacterium bovis* BCG expressando o antígeno Sm14 de *Schistosoma mansoni* (BCG/sm14). Para isso foram empregadas duas metodologias – citometria de fluxo e imunocitoquímica, para a identificação do perfil da expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α . Foram utilizados como controles a cepa Pasteur do *M. bovis* BCG e a construção da cepa Pasteur do *M. bovis* BCG contendo o vetor de expressão pAU5 (BCG/pAU5). Após padronização, a multiplicidade de infecção utilizada para os experimentos foi de 10 bacilos para 1 célula THP-1 (10MOI). A expressão da proteína Sm14 foi detectada em todos os protótipos vacinais. Para assegurar que o protótipo BCG/sm14 era capaz de diferenciar a linhagem de monócitos THP-1 em macrófagos, avaliamos a taxa de crescimento celular e foi possível observar que após a infecção estas células apresentavam o índice de proliferação diminuído em 2 logs em relação à célula não infectada. O protótipo vacinal BCG/sm14 não mostrou diferenças quanto a capacidade de infecção, a taxa de persistência intracelular e a estabilidade da construção plasmidial. As duas metodologias empregadas mostraram resultados discrepantes em relação ao percentual de citocinas expressas após a infecção com o protótipo vacinal ou os BCG controles, mostrando um maior percentual de células positivas quando avaliados por citometria de fluxo. Contudo, mesmo com esta diferença observamos que o protótipo vacinal BCG/sm14 não alterou o perfil de expressão de IL-10, IL-12 e TNF- α . O fato do plasmídeo pAU5 ser um vetor de expressão citoplasmática, sugere que a proteína Sm14 não foi capaz de estimular a mudança de citocinas em monócitos humanos. Experimentos futuros devem investigar o papel do BCG/sm14 em macrófagos maduros, quanto a indução de citocinas pró e anti-inflamatórias, TLR, bem como na indução da resposta imune adaptativa, como a apresentação antigênica, na tentativa de melhor entender a resposta imune a esta vacina candidata.

ABSTRACT

Cell cultures has been used extensively in the development of a broad range of therapeutic and prophylactic products, and are an important tool for geneticists, immunologists, vaccinologists and the pharmaceuticals industry. *In vitro* cell assay has been applied as an alternative method to replace or diminish the use of animal model in the developmental, production in vaccine test phases, with promising results. Otherwise, computational methods should amplify the use of cell cultures tools to test candidate vaccines. The main goal of this work was to develop an *in vitro* protocol using human cell line – monocytic cell THP-1, to select a vaccine prototype – strain Pasteur *Mycobacterium bovis* BCG expressing *Schistosoma mansoni* Sm14-antigen (BCG/sm14). Two methodologies were employed – a flow cytometry and immunocytochemistry, to quantify the expression of IL-10, IL-12 e TNF- α . Pasteur *M. bovis* BCG and the strain Pasteur do *M. bovis* BCG containing the expression vector pAU5 (BCG/pAU5) were used as controls. Multiplicity of infection (MOI) was determined and showed a better 10 bacilli to 1 cells ratios, regarding the expression of intracellular cytokines. Sm14 protein expression was detected in all vaccine prototype before use. To assure that BCG/sm14 was able to differentiate monocytic THP1 cell line in mature macrophage, we evaluated the proliferative ration after BCGs infection and all strain showed the ability to induce monocytic THP1 cells maturation, diminishing in 2.0 logs the cell proliferation. No differences were seen in the uptake, intracellular persistence and plasmidial stability. Interestingly, we observe discrepant results regarding the amount of positive cells expressing cytokines detected by the two methods used, independent of which BCG was tested. The overall results obtained by the cytometric method was high than immunocytochemistry. However, beside these ambiguous results, no alteration in the IL-10, IL-12 and TNF-alfa profile was observed when BCG/sm14 was compared with BCG. These results point to the plamidial BCG construction pAU5 and its intracellular expression, suggesting no modification in the cytokine profile in human monocytic cell lines. Further experiments should be addressed to identify the role of BCG/sm14 in modulate mature macrophage and, the induction of adaptive immune response, as antigen presentation, pro- and anti-inflammatory cytokines, TLR expression and activation, to better understating the vaccine prototype immune response .

1. INTRODUÇÃO

A vacinologia é uma ciência combinatória que estuda a diversidade de agentes patogênicos, o sistema imune humano e preparações vacinais que possam modular a resposta imune para prevenir ou curar as doenças causadas por esses patógenos (Brusic, August & Petrovsky 2005). Sendo a vacina um imunógeno não-patogênico que ao ser inoculado em um indivíduo é capaz de induzir imunidade protetora contra um patógeno específico (Parslow 2004), a vacinação, bem como a limitação à exposição de pessoas saudáveis às infectadas e eliminação da fonte ou meios de disseminação do agente infeccioso, contribui para a prevenção de doenças. As propriedades necessárias para uma vacina ideal são: promover imunidade ao longo da vida, ser largamente protetora contra todas as variantes do patógeno, prevenir a transmissão de doença, induzir a imunidade rapidamente, ser eficaz em todas as pessoas vacinadas, transmitir a proteção materna ao feto, possuir baixo custo, ser estável, ser segura e necessitar de poucas ou, de maneira ideal, uma só administração que induza proteção. (Ada 2001, Beverley 2002, NIAID 2003).

O desenvolvimento das vacinas ao longo da história pode ser destacado de acordo com as revoluções tecnológicas aplicadas na vacinologia (Plotkin 2005a). No final do século XVIII o médico inglês Edward Jenner realizou a experiência que foi considerada o marco da imunologia como ciência. Jenner inoculou, a partir de arranhões feitos no braço de um menino de oito anos (James Phipps), o líquido extraído da vesícula causada pela varíola bovina da mão da ordenhadeira Sarah Nelmer (André 2003, Plotkin & Plotkin 2004). Contudo, somente quase um século após a descoberta de Jenner, Louis Pasteur desenvolveu o conceito que levaria à primeira revolução da vacinologia: a atenuação da virulência de patógenos, criando a primeira vacina em laboratório e instituindo o conceito de vacinação. Pasteur estabeleceu as bases do que ficou conhecida como abordagem clássica para o desenvolvimento de vacinas, que incluem o isolamento do patógeno, a perda da virulência (atenuação) e a imunização com partes do microrganismo ou o microrganismo inteiro (Plotkin & Plotkin 2004, Plotkin 2005b, Serruto & Rappuoli 2006).

No final do século XVIII, Salmon e Smith descreveram o conceito que levaria a segunda revolução tecnológica da vacinologia, a inativação do patógeno para o desenvolvimento de preparações vacinais. A expansão deste conceito levou a

construção de vacinas feitas a partir de toxinas detoxificadas (toxóides) e frações subcelulares como polissacarídeos, proteínas e conjugados (Plotkin & Plotkin 2004, Plotkin 2005a, Plotkin 2005b). A adaptação de cultura de células para o cultivo de vírus visando a obtenção de preparações vacinais foi considerada a terceira grande revolução tecnológica utilizada pela vacinologia (Plotkin & Plotkin 2004, Plotkin 2005a, Plotkin 2005b). A introdução de novas estratégias para o desenvolvimento de vacinas a partir da utilização de técnicas de biologia molecular como: clonagem de genes e expressão de proteínas recombinantes, criação de partículas defectivas, desenvolvimento de vetores vivos atenuados, sequenciamento de genomas, genômica comparativa, proteômica e vacinologia reversa; abriram novas fronteiras na vacinologia para a busca de preparações imunogênicas que sejam efetivas no combate às doenças infecciosas. Essa nova onda de desenvolvimento está sendo considerada como a quarta revolução tecnológica da vacinologia (Ellis 2004, Plotkin 2005a, Plotkin 2005b, Serruto & Rappuoli 2006).

A compreensão e a importância da resposta imune após a vacinação sofreram um avanço notável nos últimos anos (Saalmüller 2006), marcando assim uma nova era para o desenvolvimento de vacinas. Para Plotkin (2005b), o novo foco dos vacinologistas está no desenvolvimento de meios, como vetores, replicons, lipopeptídeos e adjuvantes que dirijam a polarização do sistema imune para uma resposta do tipo 1, ou seja, a estimulação da imunidade celular. Plotkin destaca também o desenvolvimento de novas rotas de imunização tais como intranasal, aerossol, transcutânea, oral e retal (Plotkin 2005b). Já para Rappuoli (2004), a vacinologia atual está focada no processo de obtenção de imunógenos a partir da investigação pan-genômica, análise por microarranjos de DNA (*DNA microarray*) e proteômica, numa abordagem conhecida como vacinologia reversa. Serruto e Rappuoli (2006) enfatizam que o futuro do desenvolvimento de vacinas está na chamada vacinologia estrutural, na qual através da resolução atômica e da estrutura dos antígenos potenciais, será realizado o desenho racional dos epítomos alvos usados como candidatos vacinais. Observa-se então que a integração entre a tecnologia básica, os avanços tecnológicos na biologia molecular e o aumento do entendimento da resposta imune são a base para o desenvolvimento de novos candidatos a preparações vacinais (Rosenthal & Zimmerman 2006).

A imunidade, ou resposta imune, pode ser dividida em dois tipos: a imunidade inata e a imunidade adquirida ou adaptativa. A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa contra agentes patogênicos e consiste no desencadeamento de

mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que já existiam antes do estabelecimento de uma infecção e que atuam da mesma forma em infecções sucessivas. As barreiras anatômicas (pele e epitélio de mucosa), barreiras fisiológicas (temperatura, áreas com baixo pH, mediadores químicos), fagócitos mono e polimorfonucleares e barreiras inflamatórias são parte da imunidade inata (Parslow 2004, Abbas & Lichtman 2005b, McCullough & Summerfield 2005). As células da imunidade inata utilizam receptores de reconhecimento padrão (*pattern-recognition receptors* – PRR) do tipo Toll (*Toll like receptors* - TLRs) para o reconhecimento de estruturas microbianas altamente conservadas que não estão presentes em células de mamíferos, como padrões moleculares associados ao patógeno (*pathogen-associated molecular patterns* – PAMPs). Os TLRs possuem a capacidade de reconhecer diferentes PAMPs, como seqüências CpG de DNA não metiladas, lipídeos e carboidratos complexos como lipopolissacarídeos (LPS) e ácidos teicóicos (Reis e Sousa 2004b, Krutzik *et al.* 2005, Rosenthal & Zimmerman 2006).

A imunidade adaptativa caracteriza-se por sua alta especificidade e por ampliar a magnitude da resposta após sucessivas exposições a um determinante antigênico. Além dos muitos mecanismos da imunidade natural necessários à eliminação dos microorganismos invasores, a imunidade adaptativa utiliza a seleção e a mutação somática na geração de seu repertório imune desenvolvendo duas outras propriedades adicionais: a memória em relação aos contatos anteriores com um determinado antígeno, de modo que as exposições subseqüentes estimulem respostas de defesa gradativamente mais efetivas, e a capacidade de amplificar os mecanismos protetores da imunidade natural, direcionando-os para os locais de entrada do antígeno e melhorando o processo de eliminação dos elementos estranhos ao organismo hospedeiro (Costa-Carvalho & Solé 2000). A imunidade adaptativa é classificada como humoral ou celular em função do componente do sistema imunológico intermediador da resposta imune. A imunidade humoral é mediada por anticorpos, que são capazes de efetuar o reconhecimento específico agindo na neutralização de microorganismos e toxinas, na ativação do sistema do complemento e na opsonização de antígenos para aumento da fagocitose. A imunidade celular ou mediada por células (*cell-mediated immunity* – CMI) refere-se à resposta imune efetora das células T atuando na ativação de fagócitos, estimulação das atividades microbicidas dos macrófagos, células T e células *natural killer* (NK) na destruição de células infectadas. A CMI atua na defesa contra microorganismos

intracelulares, na imunidade antitumoral e na rejeição de aloenxertos (Parslow 2004, McCullough & Summerfield 2005).

As células T podem ser classificadas em dois grandes grupos de acordo com a expressão dos antígenos de superfície: T CD4 e T CD8. As células T CD8 efetoras são funcionalmente conhecidas como células T citotóxicas (T *cytotoxic* – Tc). As células Tc atuam principalmente na lise de células infectadas com patógenos presentes em seu citoplasma, desempenhando sua função através da liberação de dois tipos de citotoxinas: as granzimas, que são capazes de induzir apoptose na célula-alvo e as perforinas, que perfuram a membrana celular da célula-alvo facilitando a ação das granzimas (Esser *et al.* 2003, Kaufmann & Flynn 2005). Já as células T CD4 efetoras são funcionalmente conhecidas como células T auxiliares (T *helper* – Th). As células Th desempenham um papel central na função de vários processos como ativação, inibição, regulação, diferenciação e proliferação de diferentes tipos celulares como as células T CD8, células B, células NK, eosinófilos e macrófagos, tanto por contato célula-célula como pela produção de citocinas (Esser *et al.* 2003, Kidd 2003). As células Th são divididas principalmente em duas sub-populações fenotipicamente distintas, T *helper* tipo 1 (Th1) ou T *helper* tipo 2 (Th2), que proporcionam a estruturação de um modelo útil na compreensão da imunorregulação dependente de célula T (Mosmann & Coffman 1989, Mosmann 1991, McCullough & Summerfield 2005).

O conceito de células Th1/Th2 baseia-se na dicotomia do perfil de citocinas expressas, uma vez que cada sub-população de célula Th amplifica a si mesma e promove a regulação cruzada da sub-população recíproca. As citocinas produzidas por células Th1 são reconhecidamente capazes de suprimir a proliferação celular, a síntese de citocinas e/ou a atividade biológica induzidas por citocinas da resposta Th2, e vice-versa. Nas respostas imunes geradas pelas células Th1 as principais citocinas produzidas são as interleucinas (IL) 2 e o interferon gama (IFN- γ) direcionando o sistema imune para uma resposta mediada por células. A produção de anticorpos não é uma característica proeminente da resposta Th1, mas sua combinação com a resposta celular é necessária no combate de infecções intracelulares e fúngicas e de células cancerosas através de mecanismos diretos (destruição de células infectadas) e indiretos como a ação do interferon na proteção de células não infectadas (Esser *et al.* 2003, Kidd 2003, Rosenthal & Zimmerman 2006). Já as respostas imunes geradas pelas células Th2 são especialmente eficazes contra parasitas extracelulares e toxinas por mecanismos dependentes de

anticorpo e as citocinas dominantes produzidas são IL-4, IL-5, IL-10, e IL-13, direcionando para uma alta produção de anticorpos (Esser *et al.* 2003, Kidd 2003, Clingan *et al.* 2006, Rosenthal & Zimmerman 2006).

As células T não possuem receptores capazes de reconhecer diretamente antígenos. Os receptores de antígenos das células T (*T cell receptors* – TCRs) reconhecem somente fragmentos de antígenos expostos na superfície de outras células associados principalmente a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (*Major histocompatibility complex* - MHC). Há dois tipos principais de moléculas de MHC, denominadas de moléculas de MHC de classe I e moléculas de MHC de classe II e seu padrão de expressão está intimamente ligado às funções das células T. As moléculas MHC de classe I são expressas por todas as células do organismo exceto hemácias, sendo complexadas a antígenos encontrados no citoplasma celular e reconhecidas pelas células Tc. As moléculas MHC de classe II são expressas principalmente por células especializadas conhecidas como células apresentadoras de antígenos (*antigen presenting cells* – APC), que apresentam antígenos oriundos de vesículas endocíticas as células Th (Esser *et al.* 2003).

As APCs são células especializadas na captura de microorganismos e outros antígenos, na apresentação desses antígenos às células T e na expressão de sinais que estimulam a proliferação e diferenciação de linfócitos (Takahashi 2003, Abbas & Lichtman 2005b), possuindo um papel crucial na interação entre as imunidades inata e adaptativa. Seus principais representantes são as células dendríticas, os linfócitos B e os macrófagos (Guermonprez *et al.* 2002, Abbas & Lichtman 2005b). As células dendríticas são conhecidas como APCs profissionais por possuírem como função a captura e a apresentação de antígenos às células T virgens, promovendo juntamente com sinais co-estimulatórios, a expansão clonal e a diferenciação em células T efetoras (Guermonprez *et al.* 2002, Takahashi 2003, Reis e Sousa 2004a). As células B, dentre outras funções, são capazes de apresentar antígenos às células T efetoras sendo essenciais para a produção de anticorpos dependentes de células Th (Parlow 2004).

Os macrófagos são células fagocitárias mononucleadas, derivados dos monócitos sanguíneos e são encontrados nos tecidos desempenhando importantes papéis nas respostas imunes inata e adquirida. Possuem um papel central na resposta inicial à infecção antes da ação da imunidade mediada pelas células T e B, sendo importantes na fase de indução de inflamação, reorganização e reparo dos

tecidos, além de realizarem funções efetoras. São classificados como células apresentadoras de antígenos e têm diversas atividades, como atividade antimicrobiana e antitumoral, modulação de várias células, e promoção de quimiotaxia (Auwerx 1991, Mills *et al.* 2000, Berges *et al.* 2005).

Os macrófagos foram denominados M1 e M2 de acordo com o seu padrão de ativação (Mills *et al.* 2000). Assim, macrófagos M1 provenientes de células Th1 apresentam uma resposta efetora caracterizada pela produção dominante de óxido nítrico (NO) em resposta ao LPS ou IFN- γ exógeno. Macrófagos M2, de linhagens Th2, por sua vez, exibem um perfil tolerante caracterizado pela produção de altos níveis de fator transformador de crescimento beta (*transforming growth factor beta* - TGF- β) (Bastos *et al.* 2002, Mantovani, Sica & Locati 2005). O padrão de ativação assumido por esses macrófagos parece ser independente de linfócitos, uma vez que macrófagos de camundongos apresentam a mesma polarização. Esse fato sugere a importância das citocinas produzidas por essas células na regulação de suas funções. A influência da IL-10, IL-12, IL-18, IFN- α e IFN- γ na regulação autócrina de macrófagos tem sido descrita, demonstrando que os macrófagos não apenas obedecem às ordens dos linfócitos T, como podem até mesmo comandar o tipo de resposta dessas células. Adicionalmente, através das citocinas produzidas por eles, são aptos a se auto-regularem (Di Marzo *et al.* 1994, Fantuzzi *et al.* 2000, Mills *et al.* 2000, Xing, Zganiacz & Santosuosso 2000, Bastos *et al.* 2002, Mantovani, Sica & Locati 2005).

As citocinas constituem um grupo de proteínas de baixo peso molecular, geralmente glicosiladas, secretadas por diferentes células do sistema imune, como linfócitos, monócitos e macrófagos. Suas ações são geralmente pleiotrópicas, podendo atuar de forma autócrina, parácrina e endócrina, na mediação de diferentes efeitos biológicos (Abbas & Lichtman 2005a). Dentre as citocinas utilizadas para a avaliação de protótipos vacinais na ativação de APCs, podemos destacar TNF- α , IL-10 e IL-12 (Henriques & Sampaio 2002, Abbas & Lichtman 2005a). A IL-10 é uma citocina reguladora secretada por macrófagos ativados e por algumas células Th. Tem ação anti-inflamatória, agindo na inibição de macrófagos e células dendríticas ativadas, inibindo a ação de IL-12, TNF- α e IFN- γ , com efeitos associados ao término das reações da CMI (Standiford 2000, Atkinson *et al.* 2000, Abbas & Lichtman 2005a). A IL-12 é a principal citocina mediadora da resposta imune inata a patógenos intracelulares, dentre os quais as micobactérias, sendo um importante indutor de CMI. Atua na ativação de células T citotóxicas e células NK induzindo a

produção de INF- γ , o qual ativa os macrófagos infectados e na diferenciação das células Th1, possuindo um importante papel na interação entre a imunidade inata e adaptativa (Atkinson *et al.* 2000, Abbas & Lichtman 2005a). O TNF- α é uma das principais citocinas mediadoras da resposta pró-inflamatória produzida principalmente por fagócitos mononucleares ativados além de células T, células NK e mastócitos. Atua principalmente no recrutamento de neutrófilos e monócitos para os sítios de infecção, na indução de macrófagos e células endoteliais para secreção de quimiocinas e na indução de apoptose em algumas células (Atkinson *et al.* 2000, Standiford 2000, Abbas & Lichtman 2005a).

Os monócitos e macrófagos possuem um papel crucial na apresentação de antígenos estranhos a outras células do sistema imune e na produção de sinais que direcionam o padrão da resposta imune necessária para cada tipo de patógeno. Dentre os sinais podemos destacar as citocinas, que são proteínas imunomoduladoras que ajudam a direcionar a resposta imune em diversos processos inflamatórios incluindo processos infecciosos (Xing, Zganiacz & Santosuosso 2000, Berges *et al.* 2005). Por essas características, os macrófagos vêm sendo utilizados para avaliar o perfil imunogênico de diferentes antígenos candidatos à vacina (Campbell, Mann & Chadee 2000, Misumi *et al.* 2003, Ciabattini *et al.* 2006). Adicionalmente, é importante considerar que entre os principais requerimentos para o sucesso da vacinação está a ativação das APCs, que envolve o processamento de antígenos, a expressão de fatores co-estimulatórios, e a secreção de citocinas, que é essencial para o início da resposta imune (Ada 2004).

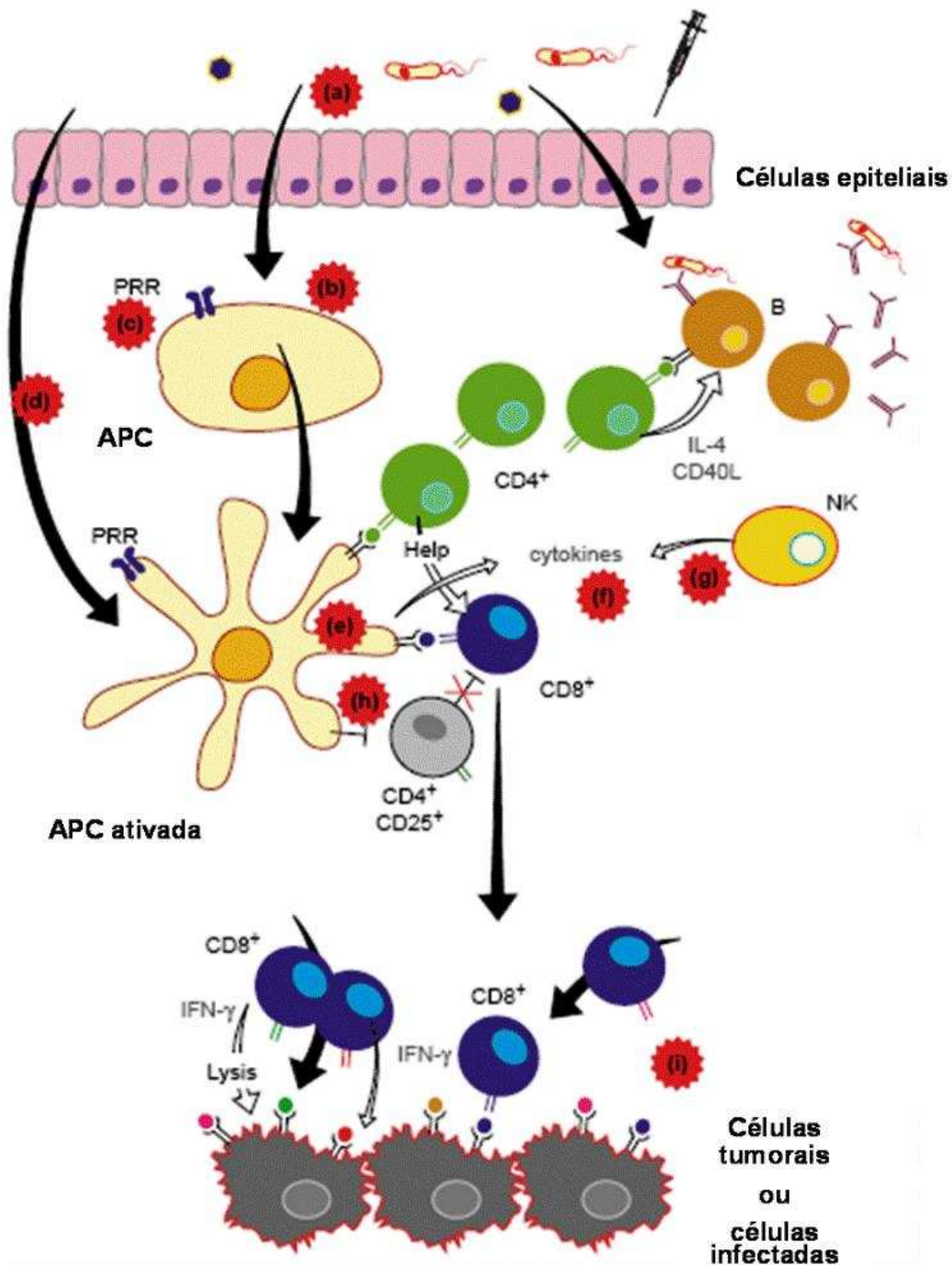


Figura 1.1: Visão esquemática da indução do sistema imune gerada por um patógeno ou uma vacina (Adaptado de Wack & Rappuoli 2005). As letras de (a) a (i) indicam situações onde o melhoramento de vacinas pode levar a respostas imunes mais eficientes. (a) A via de inoculação pode influir no tipo de resposta imune e reduzir o número de doses. (b) O antígeno particulado é reconhecido mais facilmente por APCs em relação ao antígeno solúvel. (c) Aumento da ativação de APCs através do reconhecimento de imunoestimulantes pelas PRRs. (d) A maturação e o carreamento de antígenos *in vitro* pelas APCs são candidatos vacinais promissores. (e) A vacinação de DNA leva a uma maior eficiência na apresentação de antígenos pelas moléculas de MHC de classe I. (f) O uso de citocinas como adjuvante natural de vacinas. (g) O recrutamento de células NK pode ser relacionado à produção inicial de citocinas do tipo Th1. (h) As vacinas podem atuar no efeito regulatório das células Treg CD4 CD25 visando a quebra da tolerância imunológica. (i) A pré-existência de células T específicas para antígenos expressos por células tumorais não contidos na vacina expande-se após a vacinação, predominando na resposta anti-tumor.

O advento da cultura celular no início do século passado surgiu como um método para estudar o comportamento de células dos animais sem as variações sistêmicas que poderiam surgir no animal tanto durante a homeostase, como durante um estado de estresse de um experimento (Harrison 1910, Carrel 1912 *apud* Freshney 2000b). As culturas de células vêm sendo utilizadas extensivamente para o desenvolvimento e a produção de uma variedade de produtos terapêuticos e profiláticos incluindo hormônios, citocinas, enzimas, antibióticos e vacinas tornando-se, por essa razão, uma ferramenta indispensável para geneticistas, imunologistas, vacinologistas e, especialmente, para a indústria farmacêutica (Freshney 2000a, FDA 2006).

Em 1991, Auwerx comparou diferentes linhagens de células mielóides de origem humana (HL-60, U-937, KG-1, HEL e THP-1) e concluiu que as células THP-1, após o tratamento com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), podem servir de modelo para o estudo *in vitro* dos mecanismos de regulação gênica, funções fisiológicas e diferenciação monócito/macrófago, assim como podem ser utilizadas no estudo dos vários aspectos biológicos do macrófago como o seu papel nos mecanismos de defesa e como célula secretora (Stokes & Doxsee 1999, Medeiros, 2001, Oliveira, Charlab & Pessolani, 2001, Ritelli *et al.* 2003, Theus, Cave & Einsenach, 2004, Berges *et al.* 2005, Zhao *et al.* 2005, Amadori *et al.* 2006).

A célula THP-1 é um monócito obtido a partir do sangue de uma criança com leucemia aguda (Tsuchiya *et al.* 1980, ATCC 2006). Na sua caracterização foi descrito que essas células apresentam capacidade fagocítica, expressão de lisozima e teste negativo para o vírus Epstein-Barr (Tsuchiya *et al.* 1980). Além disso, não possuem atividade citolítica dependente de anticorpo e sua diferenciação pode ser induzida por compostos do tipo ésteres de forbol como, por exemplo, 12-O-tetradecanolforbol-13-acetato (TPA) ou PMA (Tsuchiya *et al.* 1980, Stokes & Doxsee 1999, ATCC 2006).

Theus, Cave & Einsenach (2004) destacaram que as vantagens do uso da linhagem celular THP-1 como modelo de diferenciação monócito/macrófago *in vitro* são a invariabilidade da sua função de macrófago e a reprodutibilidade do crescimento celular o que permite seu estudo em diferentes estágios (normal *versus* ativado). Além disso, foi demonstrado que a diferenciação da THP-1 pode ser utilizada como modelo experimental para maturação de células dendríticas humanas

(Berges *et al* 2005) e como modelo para a avaliação da resposta inflamatória a diferentes ácidos graxos poliinsaturados (Zhao *et al.* 2005).

Stokes e Doxsee (1999) demonstraram que as células THP-1 podem ser utilizadas como modelo para investigar as interações micobacterianas em macrófagos e Medeiros (2001) utilizou-as como substrato para a avaliação da estabilidade estrutural e funcional de cepas de *Mycobacterium bovis* bacilo Calmette-Guérin (BCG) recombinante (BCGr) expressando antígeno de *Bordetella pertussis*. Oliveira, Charlab & Pessolani (2001) compararam o nível de expressão de TNF- α em células THP-1 infectadas com BCG e *Mycobacterium leprae* e, posteriormente, o uso das células THP-1 foi proposto para o desenvolvimento de uma alternativa rápida para a detecção de *M. bovis* no diagnóstico de tuberculose bovina (Ritelli *et al.* 2003, Amadori *et al.* 2006), e como modelo para avaliação da virulência e da persistência intracelular de micobactérias modificadas geneticamente (Lewis *et al.* 2003).

O Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) vem trabalhando desde 1995, com o apoio dos programas PAPES (Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde) e PDTIS (Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e de Bio-Manguinhos, na tecnologia para modificação genética da vacina BCG com o objetivo de desenvolvimento de vacinas vetorizadas contra agentes infecciosos e parasitários. Nesse processo vários cepas de BCG recombinante (BCGr) foram construídas visando a expressão de antígenos protetores de diversos patógenos como *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, o vírus da Hepatite B, entre outros (Medeiros 2001, Santos 2002, Rezende *et al.* 2005, Medeiros *et al.* 2005). Como parte desse mesmo projeto Argondizzo desenvolveu, em 2005, diferentes protótipos vacinais de BCGr expressando a proteína Sm14 de *Schistosoma mansoni* (Figura 1.2) como possíveis alternativas vacinais para a imunoprofilaxia da esquistossomose.

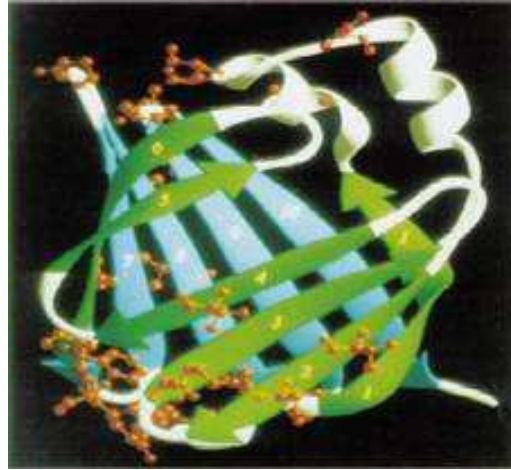


Figura 1.2: Diagrama do modelo molecular da proteína Sm14 (Adaptado de Tendler *et al* 1996)

A esquistossomose é um problema mundial. Estima-se atualmente que pelo menos 200 milhões de pessoas estejam infectados pelo *Schistosoma mansoni* e que mais de 600 milhões de indivíduos estejam em risco no Brasil e no mundo (Argondizzo 2005, Varaldo *et al.* 2006). Dentre as razões para a obtenção de uma vacina efetiva contra o *Schistosoma mansoni* está a elevada frequência da doença na população de muitas regiões, principalmente em países em desenvolvimento, podendo levar os pacientes com a forma hepatoesplênica a um padecimento crônico grave e mortal, sendo assim um grande desafio para a Saúde Pública (WHO 2000). No entanto, a Organização Mundial da Saúde (WHO) através de seu Programa Especial para Treinamento e Pesquisa (TDR), identificou seis antígenos como candidatos para o desenvolvimento de uma vacina. Dentre esses antígenos destaca-se a proteína Sm14, que é uma proteína ligante a ácidos graxos (FABP), de 14 kDa presente no esquistossômulo adulto (Chitsulo *et al.* 2000, WHO 2000, Al-Sherbiny *et al.* 2003).

Na busca de uma vacina candidata contra a esquistossomose, a estratégia de utilização da vacina BCG como vetor para a expressão de antígenos de *S. mansoni* *in vivo* é provavelmente uma das iniciativas mais importantes e de melhor relação custo - benefício no momento para o controle da esquistossomose em países sub-desenvolvidos ou em desenvolvimento (Kremer *et al.* 1998, Dai *et al.* 2003, Varaldo *et al.* 2004, Argondizzo 2005, Varaldo *et al.* 2006). Isso ocorre porque o BCG apresenta um elenco de vantagens de difícil superação entre os vetores vivos atenuados disponíveis no momento, tais como o fato de já ter sido administrado a

bilhões de pessoas no mundo inteiro com baixo índice de efeitos colaterais, poder ser administrado em qualquer época após o nascimento, não ser afetado pelos anticorpos maternos, apresentar baixo custo de produção e ser uma das vacinas mais termoestáveis que se conhece (Smith & Starke 2004, Bonah 2005, SLIPE & API 2005, WHO 2006). Além disso, possui baixo custo de produção, é estável do ponto de vista da atenuação, é controlável por antibióticos, apresenta tropismo por células responsáveis pela montagem da resposta imune (células dendríticas, macrófagos e células linfóides) e é capaz de induzir uma resposta imune celular e humoral contra bactérias, vírus, parasitas e toxinas (Ohara & Yamada 2001, Smith & Starke 2004, SLIPE & API 2005, WHO 2006). Essas características fazem do BCG um dos mais promissores vetores vivos atenuados para uma plataforma vacinal visando a liberação de antígenos heterólogos protetores *in vivo* (Medeiros 2001, Ohara & Yamada 2001, Santos 2002, Smith *et al.* 2001, Argondizzo 2005, Varaldo *et al.* 2004, Varaldo *et al.* 2006).

A capacidade do *M. bovis* BCG sub-cepa Pasteur transformado com plasmídeo pPL73 expressando a proteína Sm14 de *S. mansoni* (BCGr/pPL73-sm14) de induzir efeito protetor semelhante ou maior do que a proteção induzida por três doses da mesma proteína produzida e purificada a partir de *Escherichia coli*, foi avaliada na Fundação Oswaldo Cruz utilizando modelo murino para estudos de proteção, via intraperitoneal, com uma ou duas doses do BCGr/pPL73-sm14, em combinação ou não, com uma dose de reforço da proteína recombinante Sm14 purificada. Nessas condições demonstrou-se que o BCGr/pPL73-sm14 em dose única foi capaz de induzir aproximadamente 50% de proteção. No entanto, apesar dos camundongos vacinados com BCGr/pPL73-sm14 via intraperitoneal não apresentarem anticorpos anti-Sm14, esplenócitos desses animais liberaram IFN- γ quando estimulados com a proteína recombinante Sm14r, sendo assim capaz de induzir níveis de proteção similares àqueles induzidos pela proteína Sm14r, com a vantagem do BCGr/pPL73-sm14 ser administrado em dose única (Varaldo *et al.* 2004).

Apesar da existência na FIOCRUZ de modelo murino de proteção padronizado e aprovado internacionalmente para a avaliação de protótipos vacinais contra a esquistossomose, o grande desafio do projeto para uma nova vacina, com o protótipo BCG/sm14, é a demonstração de proteção em modelo humano. Por essa razão, objetivamos nesse trabalho o desenvolvimento de um protocolo visando o uso de células humanas na avaliação e seleção de vacinas candidatas contra a

esquistossomose. Com essa finalidade, utilizamos como substrato monócitos humanos derivados da linhagem THP-1 para avaliação e quantificação da expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α verificadas após a infecção das células THP-1 com o protótipo vacinal BCG/*sm14*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Demonstrar a viabilidade de um sistema de avaliação *in vitro* para protótipos vacinais baseado no perfil de citocinas expressas pela linhagem celular de monócitos humanos THP-1.

2.2 Objetivos Específicos

- Criar um protocolo de infecção com o *Mycobacterium bovis* BCG em células THP-1
- Avaliar a estabilidade funcional, o grau de infecciosidade e a persistência intracelular do protótipo vacinal BCG/*sm14* em células THP-1
- Avaliar a capacidade do protótipo vacina BCG/*sm14* de induzir a diferenciação e maturação de células THP-1
- Avaliar, quantificar e comparar a expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α após infecção com protótipo vacinal BCG/*sm14* e com os BCGs controles (BCG Pasteur e construção BCG/pAU5) em células THP-1

3. METODOLOGIA

3.1 Cultivo da célula THP-1

A linhagem celular THP-1 (ATCC nº. TIB 202) foi obtida do acervo do Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) de Bio-Manguinhos, Fiocruz mantidos em nitrogênio líquido (-196°C) por no máximo de 12 meses. As células foram descongeladas de criotubos Posteriormente, foram realizadas três lavagens com PBS [137mM de NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 2.7mM KCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 10mM Na₂HPO₄ (Merck) e 1.8mM KH₂PO₄ (Merck)] 1X pH 7.4. Para a manutenção celular foram testados, diversos meios de cultura (MEM, D-MEM e RPMI 1640) e suplementos [soro fetal bovino inativado – SFB (Gibco Life Technology / Invitrogen, Grand Island, EUA), HEPES (Gibco), L-glutamina Sigma-Aldrich), NaHCO₃ (Merck), 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), piruvato de sódio (Sigma-Aldrich), estreptomicina/penicilina (Gibco), gentamicina (Gibco)]. Após observação morfológica das células por microscopia óptica (400 x), definiu-se que para os experimentos propostos seria utilizado o meio de cultura foram cultivadas inicialmente em meio RPMI 1640 (Gibco) formulado com 0,2% (v/v) de NaHCO₃ (Sigma-Aldrich), suplementado com 20% (v/v) de SFB e mantidas em garrafas T de 25 cm² (Corning, Corning, EUA) a 37°C em atmosfera com 5% de gás carbônico (CO₂) por 3 dias.

Quando da necessidade de se ampliar o acervo desta linhagem, as células foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos, lavadas duas vezes em PBS e ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB. A concentração e viabilidade celular foram determinadas em hemocítmetro por microscopia óptica (100 x) utilizando-se a diluição de 1:50 em azul de tripan 0,4% (Gibco). Para a criação dos lotes de trabalho, após as etapas de centrifugação e lavagem, as células foram ressuspensas na concentração de 1 x 10⁷ células/mL em solução de criopreservação [90% SFB e 10% dimetil sulfóxido (DMSO - Sigma-Aldrich)] e mantidas em nitrogênio líquido a – 196°C.

No preparo das células para a realização dos experimentos, as células foram removidas do meio de cultura original, lavadas duas vezes em PBS, ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB. Após a quantificação as células foram ressuspensas na concentração de 1 x 10⁶ células/mL em RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB.

3.2. Cultivo das cepas de BCG

Para a presente proposta foi utilizado o protótipo vacinal *M. bovis* BCG sub-cepça Pasteur 1173P2 transformada com o vetor plasmidial pAU5 contendo o gene *sm14* de *S. mansoni* (BCG/*sm14*). Como controle dos experimentos, foram utilizados a amostra vacinal *M. bovis* BCG sub-cepça Pasteur 1173P2 (BCG-P), assim como o *M. bovis* BCG sub-cepça Pasteur transformado o plasmídeo pAU5 (BCG/pAU5). Os BCGs recombinantes foram desenvolvidos no LATER pelos pesquisadores Dr. Douglas MacIntosh e Msc. Ana Paula C. Argondizzo (Argondizzo 2005) (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Características das cepas de BCG

Cepas	Características
BCG-P	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepça Pasteur 1173P2
BCG/pAU5	<i>M. bovis</i> BCG sup-cepça Pasteur Vetor pAU5: <i>kanR</i> , <i>oriE</i> , <i>oriM</i> , <i>Phsp60</i> *
BCG/ <i>sm14</i>	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepça Pasteur Vetor pAU5/ <i>sm14</i> : <i>kanR</i> , <i>oriE</i> , <i>oriM</i> , <i>Phsp60</i> *, <i>sm14</i>

pAU5 - vetor de expressão citoplasmático

kanR - gene de resistência à canamicina derivado do Tn903

oriE - origem de replicação do bacteriófago T4 de *Escherichia coli*

oriM - origem de replicação do plasmídeo pAL5000 de *Mycobacterium fortuitum*

*Phsp60** - promotor *hsp60* de *Mycobacterium bovis* BCG modificado

sm14: gene de *Schistosoma mansoni*

Os BCGs foram estocados em alíquotas e armazenados a -70°C. No momento do uso as alíquotas foram descongeladas e cultivadas em 20 mL de caldo Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA) suplementado com 10% (v/v) da solução Albumina – Dextrose – Catalase (ADC - Difco), 0,05% (v/v) de Tween 80 (Merck) e 0,2% (v/v) de glicerol (Sigma-Aldrich) a 37⁰ C e 5% CO₂ por 10 dias, quando atingem a fase exponencial de crescimento.

Para o preparo dos inóculos, o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG e BCG-pAU5) foram obtidos a partir de culturas em fase exponencial. Os BCGs foram

centrifugados a 1950 x g e lavados duas vezes em PBS. Após a lavagem, a concentração de cada amostra de BCG foi ajustada com PBS para o padrão 1 da escala de MacFarland (MacFarland, 1907), ou seja, $3,0 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro. Uma alíquota de 10 μ L desta suspensão bacteriana foi quantificada em hemocitômetro por microscopia ótica (100x), para confirmação da leitura por turbidez.

Devido à dificuldade para a determinação da viabilidade dos BCGs em UFC utilizando o meio Middlebrook 7H10 (Difco) suplementado com 10% (v/v) de ADC preparado no laboratório, buscaram-se diferentes alternativas, como a substituição do lote do meio Middlebrook 7H10, utilização do meio Middlebrook 7H11 e suplementação dos meios com ADC e OADC comercial (Difco).

Em cada experimento, o número de bactérias viáveis foi determinado através de plaqueamento de diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) em triplicata, em meio ágar Middlebrook 7H11 (Difco) suplementado com 10% (v/v) da solução de Ácido oléico - Albumina - Dextrose - Catalase (OADC – Difco) e 0,2% (v/v) de glicerol. As placas foram incubadas por quatro semanas em estufa a 37°C em 5% CO₂.

3.3 Avaliação da expressão da proteína recombinante Sm14 em BCG/sm14

Para a confirmação da expressão da Sm14 pela cepa BCG/sm14 foi utilizado a técnica de *western blotting* com base no protocolo descrito por Argondizzo (2005). Amostras de 4 mL das culturas bacterianas foram centrifugadas por 5 minutos a 6500 x g a temperatura ambiente sendo o precipitado rompido por lise mecânica utilizando-se 0,5 g de pérolas de vidro de 0,5 mm de diâmetro (BioSpec Products – Bartlesville, EUA), 60 μ L de tampão Tris-HCl 1 mM 50 mM pH 6.8 e 20 μ L de tampão de amostra 4X (Tris-HCl 50mM pH 6,8, DTT 100mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%). As amostras foram agitadas inicialmente por 45 segundos sendo colocadas em gelo por um minuto e posteriormente agitadas por 30 segundos, utilizando-se o aparato “Mini Beadbeater” (Biospec Products, Bartlesville, Canada). Em seguida, as amostras foram fervidas por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida 13,5% [técnica de SDS-PAGE (Laemmli 1970)] com espaçador de 1 mm. A corrida foi realizada a 100 volts, no gelo. O material do gel foi transferido para membrana de duralose (Duralose – UVTM Membranes – Stratagene, La Jolla, CA, EUA), sendo a transferência realizada por 90 minutos a 90 volts, no gelo.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada em solução de 3% (p/v) de albumina bovina (BSA - Sigma-Aldrich) em PBS pH 7.4 com 0,02% (v/v) de Tween 20 (PBS-T) por um período de 2 horas a temperatura ambiente e sob leve agitação. A seguir a membrana foi incubada com o anticorpo primário policlonal anti-Sm14 (produzido em coelhos New Zealand no Laboratório de Esquistossomose Experimental, Departamento de Helminologia, IOC, FIOCRUZ), diluído 1:500 ou 1:1000. A membrana foi incubada com o anticorpo primário a temperatura ambiente por um período de 16 a 18 horas (*overnight*), a seguir a membrana foi lavada duas vezes com PBS-T por cerca de 40 minutos e duas vezes com PBS pelo mesmo tempo. O anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich), foi diluído na razão 1:30.000 em PBS-T e a membrana incubada por 2 horas sob agitação leve a temperatura ambiente. A seguir procederam-se novamente as lavagens como descrito anteriormente. Após as lavagens, a membrana foi revelada com 5 mL da solução “Western Blue^R Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase” (Promega, Madison, EUA).

3.4 Padronização da multiplicidade de infecção (MOI) do BCG-P

No intuito de verificar a produção de citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α por células THP-1 induzidas por diferentes inóculos de BCG-P, as células foram infectadas numa relação de 5, 10 ou 50 UFC de BCG para cada célula THP-1. Para este ensaio foram definidos apenas dois tempos de infecção: 4 e 24 horas. Foram incubadas 1×10^6 células THP-1 com 5×10^6 , 1×10^7 ou 5×10^7 de BCG-P, em triplicata, mantidos em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB em tubos cônicos de 1,5 mL e incubadas por 4 horas, sob agitação (120 rpm) a 37°C em ambiente com 5% CO₂.

Após este período, as amostras foram centrifugadas a 400 x g e lavadas três vezes com PBS. Após a lavagem, as amostras referentes a avaliação de 4 horas de infecção foram homogeneizadas com 1 mL de meio RPMI 1640, sendo retirados 100 μ L para a recuperação dos BCGs intracelulares, e 900 μ L para avaliação da expressão de citocinas secretadas por células THP-1 infectadas com BCG pela técnica de citometria de fluxo. Já as amostras de 24 horas de infecção, foram homogeneizadas com 1 mL de meio RPMI 1640 com 10% (v/v) de SFB e incubados, sob agitação (120 rpm) a 37°C em ambiente com 5% CO₂ até o término do tempo

proposto (24 horas) sendo posteriormente processadas da mesma forma que as amostras de 4 horas.

Para o acompanhamento da viabilidade dos BCGs intracelulares, nos 100 µL retirados das amostras, foram adicionados 900 µL de tampão PBS com 0,1% (v/v) de Tween 80 (Pro Analysis, Rio de Janeiro) e centrifugados por 10 minutos a 6500 x g, para lisar as células THP-1 e obter os BCGs antes internalizados. O precipitado então foi diluído em 100 µL de meio Middlebrook 7H9 e plaqueado em meio Middlebrook 7H11 para determinação de UFC, como descrito no item 3.2.

3.5 Infecção do BCG/*sm14* e BCGs controles em células THP-1

Os experimentos envolvendo a produção de citocinas em células THP-1 infectadas com BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5) foram realizados como descrito no item 3.4, utilizando MOI de 10 micobactérias para 1 célula THP-1 nos tempos de 4, 24 e 48 horas pós-infecção. Para a análise do perfil de citocinas expressas pela célula THP-1 infectada com as diferentes amostras de BCG utilizaram-se as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo.

3.6 Avaliação da capacidade de proliferação celular da célula THP-1

Para avaliar a capacidade de replicação e a viabilidade celular das células THP-1 infectadas com BCG/*sm14* e os BCGs controles, um cultivo celular foi estabelecido por um período de 24 e 48 horas após a infecção. As células THP-1 foram infectadas com MOI de 10 micobactérias para 1 célula THP-1 como descrito no item 3.3. As amostras contendo $2,5 \times 10^5$ células THP-1 infectadas ou não com os BCGs, foram suspensas em 100 µL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB por poço em placas de 96 poços. Dezesesseis horas antes do término do tempo de infecção, foi adicionado 1µCi de timidina tritiada (Timidina-H³ - Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA) por poço e as placas foram mantidas em estufa a 37°C em ambiente com 5% CO₂. Ao término dos tempos de infecção (24h e 48h) as placas foram congeladas a -20°C até a realização da leitura.

No dia de leitura, as placas foram descongeladas a temperatura ambiente e as amostras foram transferidas através do coletor de células (Cell Harvester - Skation Instruments AS, Lier, Noruega) para o papel de filtro (FilterMAT - Skation Instruments AS). As amostras no papel de filtro foram colocadas em tubos de

cintilação sendo adicionado 1 mL por tubo de solução de cintilação [Difeniloxazol (PPO - Merck), Bis-feniloxasolilbenzeno (POPOP - Merck), Tolueno (Merck)]. As amostras foram contadas em espectrômetro de cintilação líquida (TRI-CARB® 1600 CA, Packard, Milano, Itália) e o resultado expresso em contagem por minuto (cpm).

3.7 Avaliação da estabilidade funcional (expressão do gene *kanR*) do vetor de expressão pAU5 dos BCGr

A confirmação das cepas recombinantes de BCG transformadas com os plasmídeos pAU5 e pAU5-*sm14* foi determinada através do plaqueamento de diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}), em triplicata, dos inóculos utilizados para infecção e dos BCGs recuperados das células THP-1 nos diferentes tempos de infecção (descrito no item 3.4), em meio ágar Middlebrook 7H11 suplementado com 10% (v/v) de OADC e 0,2% (v/v) de glicerol, adicionado ou não de 25 µg/mL de canamicina (Kan - Sigma-Aldrich), para a avaliação da expressão do gene *kanR* contido no vetor de expressão pAU5. As placas foram incubadas por quatro semanas para determinação de UFC em estufa a 37°C em ambiente com 5% CO₂.

3.8 Protocolo de imunocitoquímica para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1

As amostras das células THP-1 infectadas com o BCG/*sm14* e os BCGs controles foram removidas 4, 24 e 48 h após a infecção, centrifugadas a 400 x g, lavadas três vezes com PBS e mantidas em 1mL de PBS.

Utilizando uma centrífuga citológica (Citospin modelo 2400 – Fanem, São Paulo), as células foram transferidas para lâminas de microscopia (Solidor – Médico International Trading Co, Tianjin, China) previamente tratadas com 2 % (v/v) de silano (Sigma-Aldrich) em acetona PA (Merck). De cada amostra, foram adicionados 150 µL em cada orifício seguido de centrifugação a 1800 rpm por 3 minutos.

As células foram fixadas com 4% de paraformaldeído pH 7,4 (Sigma-Aldrich), por 15 minutos, e lavadas em tampão Tris base salina (TBS) com 0,2% (v/v) de Tween20 (Merck), pH 7,4 10 mM (TBS-T) por 10 minutos. A seguir, foram adicionados 50 µL de SFB diluído em TBS-T (1:100) por 30 minutos, com o objetivo de impedir ligações inespecíficas. Após a remoção do soro, foram adicionados 50 µL

dos anticorpos monoclonais primários (Tabela 3.2) diluídos em TBS-T. As lâminas foram incubadas em câmara úmida *overnight* a 4°C.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com TBS-T (3 banhos por 5 minutos cada) e incubadas com 50 µL de anticorpo secundário biotilado (Tabela 3.1). Após 30 minutos, as lâminas foram lavadas com TBS-T em três banhos por 5 minutos cada e foram adicionados 50 µL do complexo estreptoavidina-peroxidase (Dako, Glostrup, Dinamarca) por 30 minutos em câmara úmida, lavando-se em seguida três vezes por 5 minutos cada com TBS-T. Para a revelação, foram adicionados 50 µL em cada amostra da solução de 3-3' diaminobenzidina (DAB - Dako) sendo acompanhada a conversão da tonalidade em microscópio óptico (400 x). A reação foi finalizada mergulhando as lâminas em água destilada e, posteriormente, em água corrente. A seguir, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer (Dako) por 2 minutos, e posteriormente lavadas em água corrente. Logo após, as lâminas foram desidratadas em etanol (Merck) por 10 minutos, diafanizadas em xilol (Merck) por 10 minutos e montadas em “Faramount Mounting Medium, Aqueous” (Dako) entre lamínulas (Corning).

O percentual de células, expressando as citocinas IL-10, IL-12 e TNF-α após infecção com BCG/*sm14*, BCG-P ou BCG/pAU5 por 4, 24 e 48 horas foi determinado pela contagem de células positivas em um campo de duzentas células, utilizando microscopia óptica (1000x).

Tabela 3.2: Anticorpos utilizados no protocolo de imunocitoquímica

Anticorpo Primário	Origem	Diluição	Empresa	Anticorpo Secundário
anti-IL-10 humana	Rato	1:75	Mabtech AB Nacka Strand, Suécia	Coelho anti-rato (Dako)
anti-IL-12 (p70) humana	Camundongo	1:200	Mabtech AB Nacka Strand, Suécia	Kit LSAB – anti-camundongo, anti-coelho e anti-cabra (Dako)
anti-TNF-α humana	Cabra	1:25	R&D Systems Minneapolis, USA.	Kit LSAB – anti-camundongo, anti-coelho e anti-cabra (Dako)

3.9 Protocolo de citometria de fluxo para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1

Os experimentos envolvendo a produção de citocinas em células THP-1 mediada pela infecção com BCG/*sm14* e os BCGs controles foram realizados como descrito no item 3.5. Nas amostras onde a infecção ocorreu por 24 horas e 48 horas foram adicionadas 1 μ L de brefeldina A (BD Biosciences / Becton Dickinson & Company, San Diego, EUA) 4 horas antes do término de cada tempo de infecção, atuando na inibição do complexo de Golgi por este ser o principal centro de distribuição da célula, visando o acúmulo de citocina no interior da célula.

As amostras foram ressuspensas em 50 μ L da solução *Cytofix/Cytoperm* (BD Biosciences), homogeneizadas no agitador de tubos (Fanem) e incubadas por 20 minutos em gelo. Em seguida foram adicionados 150 μ L de PBS, as amostras foram centrifugadas por 10 segundos a 6500 x *g* e ressuspensas em 200 μ L tampão *Perm/Wash* 1X (BD Biosciences) adicionado com 10% (v/v) de soro AB humano (Sigma-Aldrich). Os anticorpos (Tabela 3.2) diluídos no tampão *Perm/Wash* adicionado com 10% (v/v) de soro AB humano foram adicionados as amostras e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram lavadas uma vez com 400 μ L de *Perm/Wash* e uma vez com 400 μ L PBS.

A leitura das amostras foi realizada no citômetro Coulter EPICS XL-MCL (Beckman Coulter, Fullerton, EUA), utilizando o filtro *Band Pass* (BP) de 525 nm para a leitura dos anticorpos marcados com fluorocromo Ficoeritrina (PE) e o filtro BP de 575 nm para leitura do anticorpo marcado com fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Tabela 3.3) e analisadas no programa WinMDI versão 2.8. A seleção da região de interesse (R1) foi realizada em gráficos de distribuição em pontos de tamanho celular relativo (*Foward angle light scatter* - FSC) versus granulosidade celular (*Side angle light scatter* - SSC), de onde foram excluídos tanto restos como grumos celulares, sendo analisado um mínimo de 20 mil eventos por amostra.

Tabela 3.3: Anticorpos utilizados no protocolo de citometria de fluxo

Anticorpo Primário	Origem	Diluição	Empresa	Fluorocromo	Filtros (Band Pass)
anti-IL-10 humana	Rato	1:200	BD Biosciences	PE	575 nm
anti-IL-12 (p70) humana	Camundongo	1:200	BD Biosciences	PE	575 nm
anti-TNF- α humana	Camundongo	1:800	BD Biosciences	FITC	525 nm

4. RESULTADOS

4.1 Cultivo da célula THP-1

Para a padronização da manipulação da célula THP-1 foram determinados parâmetros para o meio de cultivo e manutenção.

4.1.1 Meios de cultivo.

Foram testados, diversos meios de cultura (MEM, D-MEM e RPMI 1640) e suplementos (SFB, HEPES, L-glutamina, NaHCO_3 , 2-mercaptoetanol, piruvato de sódio, estreptomicina/penicilina, gentamicina) e após observação morfológica das células por microscopia óptica (400 x), definiu-se que para os experimentos propostos seria utilizado o meio de cultura RPMI preparado com 0,2% (v/v) de NaHCO_3 , sendo suplementado com SFB nas concentrações de 20% para o descongelamento e 10% para a manutenção e experimentos. O uso de outros suplementos de crescimento como piruvato de sódio e 2-mercaptoetanol não se mostraram necessários (dados não mostrados).

4.1.2 Manutenção

A manutenção da célula THP-1 foi realizada a cada 3-4 dias, contudo, foi estipulado após observação morfológica, que os experimentos seriam realizados com células que estivessem na terceira ou quarta passagem (Figura 4.1). Da mesma forma, para a criação dos lotes de trabalho e reposição do acervo, as células THP-1 seriam mantidas até a oitava passagem.

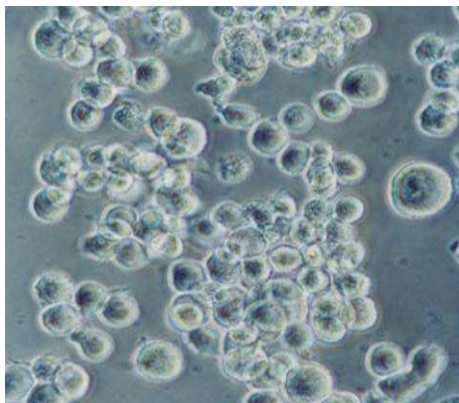


Figura 4.1 Microscopia óptica (200 x) de células THP-1, após três passagens, mantidas em meio RPMI 1640 preparado com 0,2% de NaHCO_3 e suplementado com 10% de SFB.

4.2. Cultivo das cepas de BCG

Para o cultivo das cepas BCG-P, BCG/pAU5 e BCG/sm14 foi utilizado a metodologia usualmente aplicada no LATER (Medeiros 2001, Santos 2002, Argondizzo 2005). Entretanto devido à dificuldade para a determinação da viabilidade dos BCGs em UFC utilizando o meio Middlebrook 7H10 (Difco) suplementado com 10% (v/v) de ADC preparado no laboratório, buscaram-se diferentes alternativas, como a substituição do lote do meio Middlebrook 7H10, utilização do meio Middlebrook 7H11 e suplementação dos meios com ADC e OADC comercial (Difco).

A quantificação dos BCGs obtida, em UFC, após o plaqueamento em diferentes formulações dos meios Middlebrook 7H10 e 7H11, foi confrontada com a quantificação das amostras em hemocitômetro e no ajuste ao padrão 1 do sistema de McFarland. Os resultados demonstraram que os BCGs cultivados em meio Middlebrook 7H11 preparado com 0,2% de glicerol e suplementado com 10% de OADC (Figura 4.2) obtiveram a mesma quantidade de UFC que as amostras ajustadas ao padrão 1 do sistema de McFarland e quantificadas em hemocitômetro.

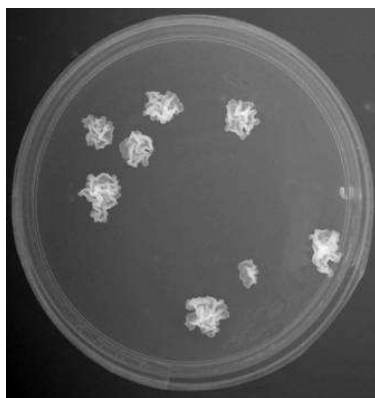


Figura 4.2 Cultura de *M. bovis* BCG Pasteur em meio 7H11 suplementado com 10% de OADC.

4.3 Expressão da proteína Sm14 pelo BCG/*sm14*

A técnica de *Western blot* foi empregada para avaliar a expressão da proteína Sm14 pelos quatro clones da construção BCG/*sm14* utilizados nos experimentos de infecção em células THP-1.

Foi utilizada como padrão (P), 20 ng da proteína Sm14r produzida em *E.coli*, gentilmente cedida pela Dr^a. Miriam Tendler (Laboratório de Esquistossomose Experimental – IOC/Fiocruz) onde em virtude do aquecimento observam-se duas bandas, referentes à proteína Sm14r e seu dímero. Nas linhas 1 a 4 foram aplicados como controle, amostras de 4 clones de BCG/pAU5, onde se observam bandas inespecíficas. Nas linhas 5 a 8 foram aplicadas amostras de 4 clones de BCG/*sm14*, destacando-se em vermelho as bandas correspondentes a proteína Sm14r produzida em BCG, sendo visualizado também o dímero dessa proteína (Figura 4.3).

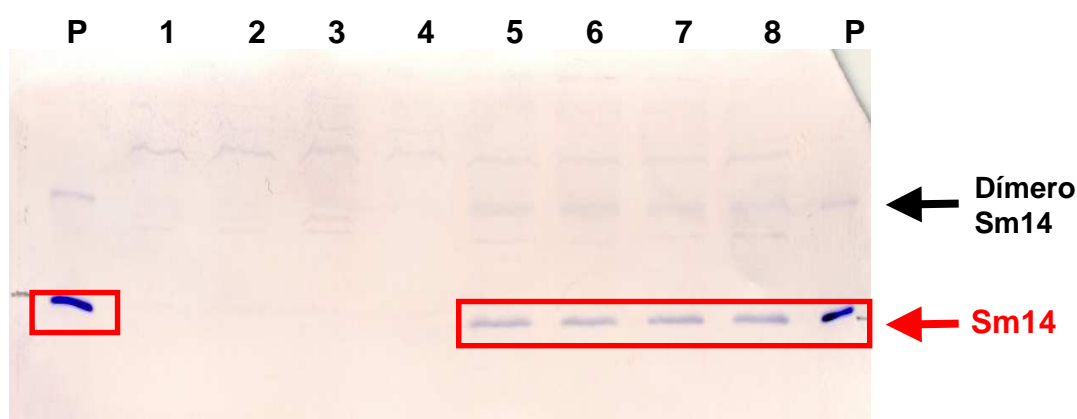


Figura 4.3 Expressão da proteína Sm14 produzida pelos quatro clones de BCG/*sm14* utilizados nos experimentos de infecção (linhas 5-8). Como controle foram usados 20 ng da proteína Sm14 (indicada pela letra P) e as proteínas totais dos quatro clones de BCG/pAU5 utilizados nos experimentos de infecção (linhas de 1-4).

4.4 Multiplicidade de infecção (MOI) BCG:THP-1

Para a determinação da melhor relação micobactéria-célula THP-1 a ser utilizada para se testar os BCG recombinantes, foi utilizada a quantificação da expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α , após 4 e 24 horas de infecção pela técnica de citometria de fluxo. Foi realizado um experimento onde foram testadas três relações micobactéria-célula THP-1: 5, 10 e 50 células de BCG-P para cada célula THP-1. Os resultados evidenciados e demonstrados na figura 4.4, indicam

que um percentual pequeno de células THP-1, mesmo sem estímulos, é capaz de secretar essas citocinas em nível basal (2,9%, 5,3%, 3,0% para IL-10, IL-12 e TNF- α , respectivamente). Estes percentuais permanecem estáveis após 4 horas de infecção com o BCG-P. Entretanto, após 24 horas de infecção com BCG-P, o percentual de células secretando IL-10 foi de 4,8%, 13,4% e 5,7% quando infectadas respectivamente por 5, 10 e 50 micobactérias-célula THP-1, indicando que para esta citocina a melhor relação micobactéria-célula THP-1 é de 10:1 (Figura 4.2). Para IL-12 foi possível observar que 4,8%; 12,7% e 6,1% das células infectadas expressavam esta citocina em resposta à mesma relação micobactéria-célula THP-1. Contudo, observamos um perfil diferente quanto à secreção de TNF- α , 10,5%, 5,97% e 4,23%, indicando que a melhor dose resposta foi obtida com a relação de 5 micobactérias-célula THP-1.

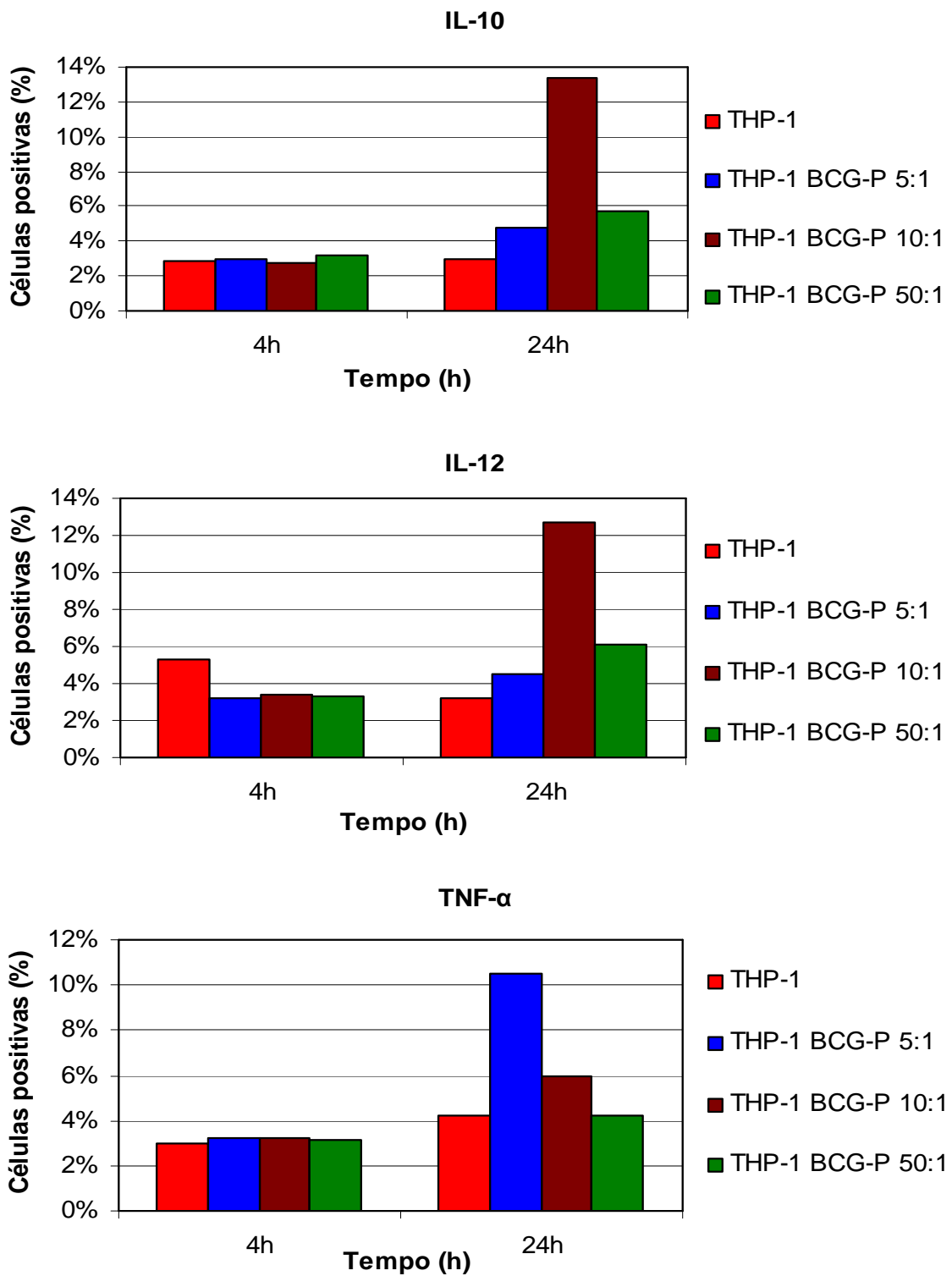


Figura 4.4. Expressão de IL-10, IL-12 e TNF- α em células THP-1 infectadas com *M. bovis* BCG sub-cepa Pasteur 1173P2 utilizando diferentes relações micobactéria-célula.

4.5 Capacidade de proliferação da célula THP-1 infectada pelo BCG/*sm14* e BCGs controles

A avaliação da capacidade de replicação das células THP-1 infectadas ou não pelo BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5) foi realizada pela técnica de proliferação celular através da absorção de timidina tritiada (cintilação). Os resultados obtidos em um experimento demonstram que as células THP-1 tiveram seu crescimento celular reduzido em mais de dois \log_{10} , 24 e 48 horas após a infecção com o BCG/*sm14* e os BCGs controles, não havendo diferença entre os BCGs. Os resultados indicam que a linhagem monocítica THP-1 tem sua diferenciação celular interrompida após infecção com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (Figura 4.5).

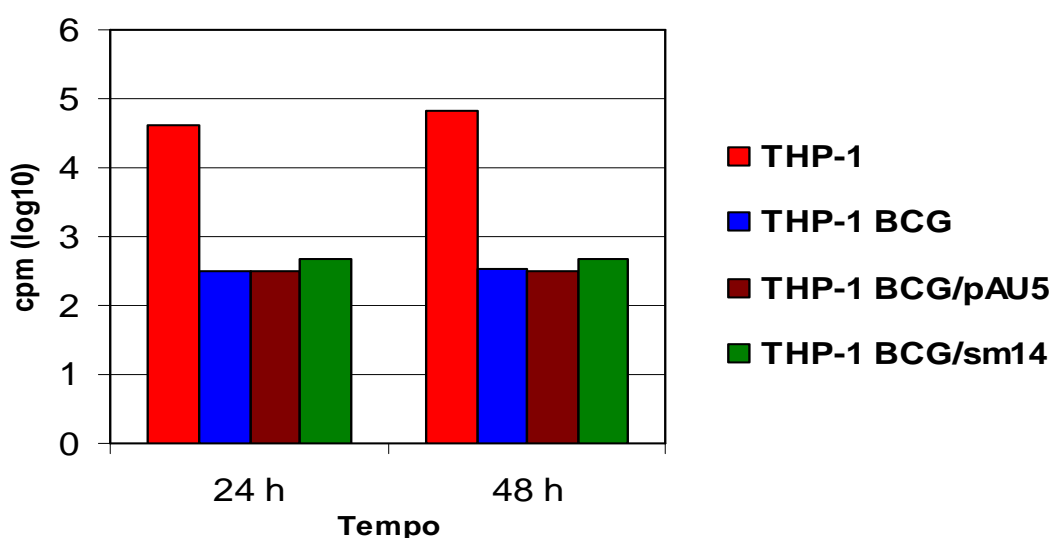


Figura 4.5: Atividade proliferativa das células THP-1 infectadas pelo BCG/*sm14* e pelos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5). Os resultados estão expressos em contagem por minuto (cpm).

4.6 Avaliação da viabilidade e estabilidade funcional (expressão do gene *kanR*) dos BCG/*sm14* e BCGs controles recuperados das células THP-1

A capacidade de infecção e manutenção do crescimento intracelular dos BCGs foi realizada em paralelo aos três experimentos de infecção com as cepas de BCG em células THP-1. A determinação comparativa das UFC dos cultivados em meio 7H11 seletivo (com canamicina – 7H11/Kan) e meio 7H11 não seletivo, permitiu avaliar a estabilidade funcional dos BCGs recombinantes (Figura 4.6).

Foi possível observar que de 3 a 7,5% dos BCGs não foram capazes de penetrar ou permanecerem aderidos a membrana das células THP-1, pois após 4 horas de infecção houve uma redução no número de bacilos utilizados para a infecção (tempo 0). Praticamente não houve diferença entre o número de bacilos recuperados entre o BCG/*sm14* e os BCGs controles, indicando que a presença do plasmídeo não alterou a capacidade dos BCGs recombinantes de penetrarem na célula.

Da mesma forma não observamos diferença entre os BCG/*sm14*, BCG-P e BCG/pAU5 quanto a capacidade de multiplicação intracelular, visto a manutenção entre o número de UFC recuperadas após 24 horas ($5,4 \log_{10}$, $5,7 \log_{10}$ e $5,4 \log_{10}$) e 48 horas ($5,3 \log_{10}$, $5,6 \log_{10}$ e $5,2 \log_{10}$). Uma redução entre 0,1 e $0,3 \log_{10}$ foi observada entre o período basal de 4 horas e após 24 e 48 horas.

Na avaliação da estabilidade funcional dos BCGs recombinantes, observamos que não houve diferença expressiva entre o cultivo dos BCG/*sm14* e BCG/pAU5 nos meios Middlebrook 7H11 e 7H11/Kan em todos os tempos avaliados. Como controle do meio seletivo, foram plaqueadas amostras de BCG, não sendo observado nenhum crescimento.

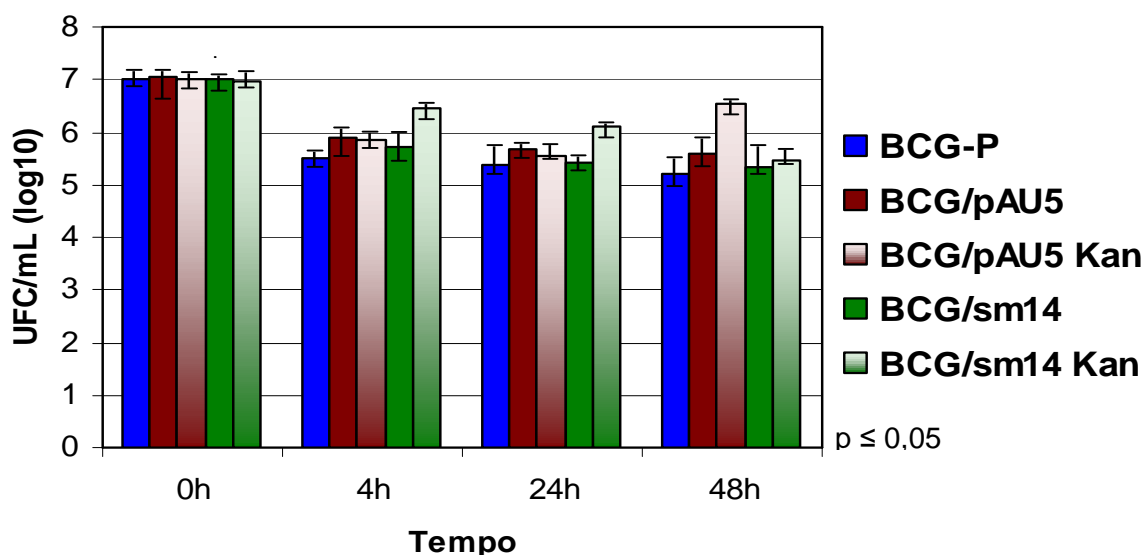


Figura 4.6 Gráfico da cinética da viabilidade do protótipo vacinal BCG/sm14 e dos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), recuperados de células THP-1 e cultivados nos meios Middlebrook 7H11 e 7H11/Kan (Três experimentos em triplicata).

4.7. Avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção do BCG/sm14 e BCGs controles em células THP-1 por imunocitoquímica

Para a detecção intracelular das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α produzidas pela infecção com BCG/sm14, BCG-P e BCG/pAU5 nas células THP-1 pela técnica de imunocitoquímica, com base na dissertação da Msc. Ana Teresa Gomes Fernandes (Fernandes 2003). Devido às dificuldades de adaptação deste procedimento à técnica de imunocitoquímica, foram avaliados diferentes parâmetros como condições de incubação dos anticorpos primários (1 hora a 25°C ou *overnight* a 4°C), tampões (HBSS, TBS-T, PBS-Saponina) e fixadores (paraformaldeído 4% ou acetona PA). Após observação morfológica por microscopia óptica (1000 x), determinou-se que os anticorpos primários deveriam ser incubados com as amostras a 4°C por 16-18 horas (*overnight*), sendo utilizado o tampão TBS-T e as amostras fixadas com paraformaldeído 4%.

Foi possível identificar por esta metodologia a produção de citocinas pelas células THP-1 (Figura 4.7). O percentual de células expressando cada citocina foi determinado após 4, 24 e 48 horas de infecção pelo BCG-P, BCG/pAU5 e BCG/sm14 através da média de três experimentos, sendo demonstrado o desvio padrão pela barra de erro. A expressão basal destas citocinas foi também determinada em células não infectadas, onde se observou que a citocina IL-10 foi

expressa por 5,0%, 10,7% e 6,4% das células THP-1, sendo que 8,8%, 8,2% e 3,4% produziram IL-12 e 3,6%, 6,5% e 2,2% expressaram TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente. Após a infecção com BCG-P, 5,9%, 6,5% e 5,5% expressavam IL-10; 9,45%, 4,6% e 6,1% expressaram IL-12 e 6,8%, 6,4% e 5,2% TNF- α , durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente. Na infecção de células THP-1 com o recombinante controle BCG/pAU5, 7,3%, 9,9% e 2,9% expressaram IL-10, na produção de IL-12 foram observados 9,9%, 8,3% e 7,1% de células e 4,1%, 5,5% e 1,5% de células produziram TNF- α . Durante a infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, foram detectadas 5,3%, 9,3% e 6,2% de células expressando IL-10; 9,4%, 10,4% e 4,3% de células produtoras de IL-12 e 4,5%; 7,1% e 6,0% de células fabricantes de TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente (Figura 4.7).

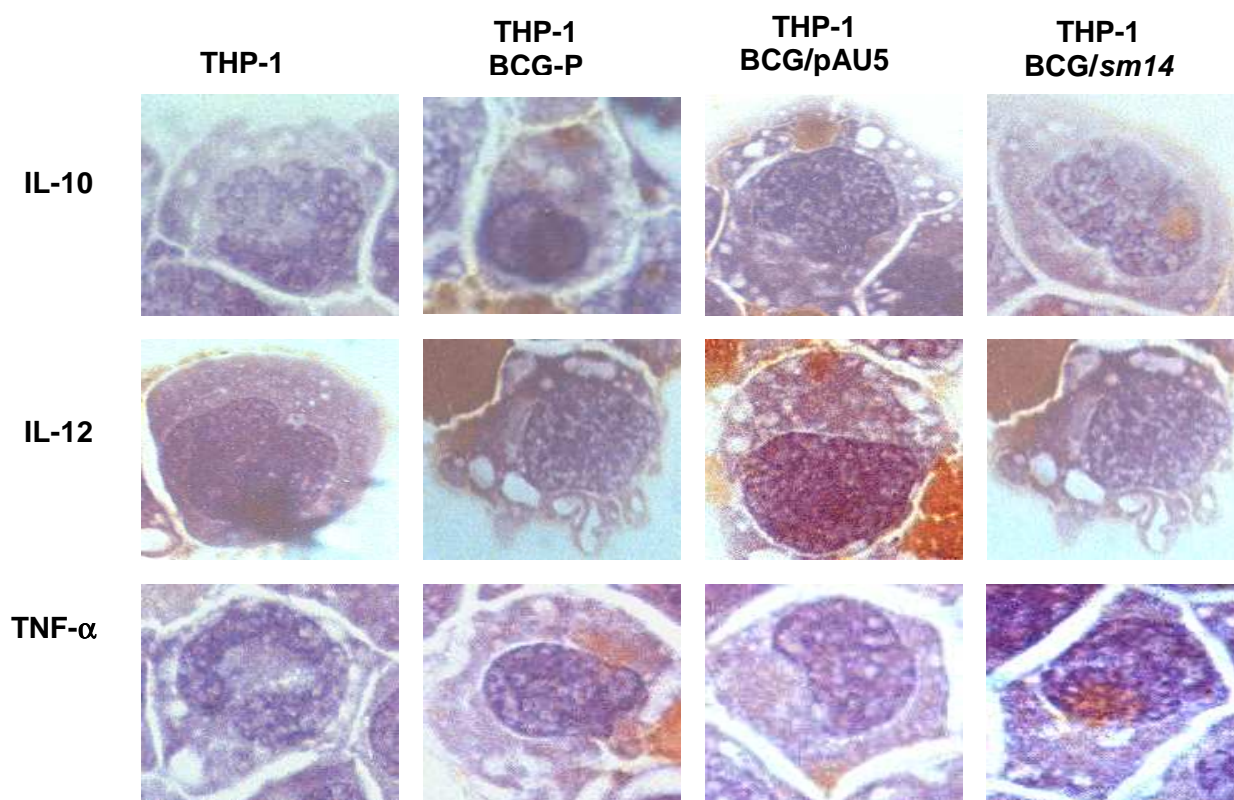


Figura 4.7 Microscopia óptica (1000 x) de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após 24 horas de infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), detectadas por imunocitoquímica.

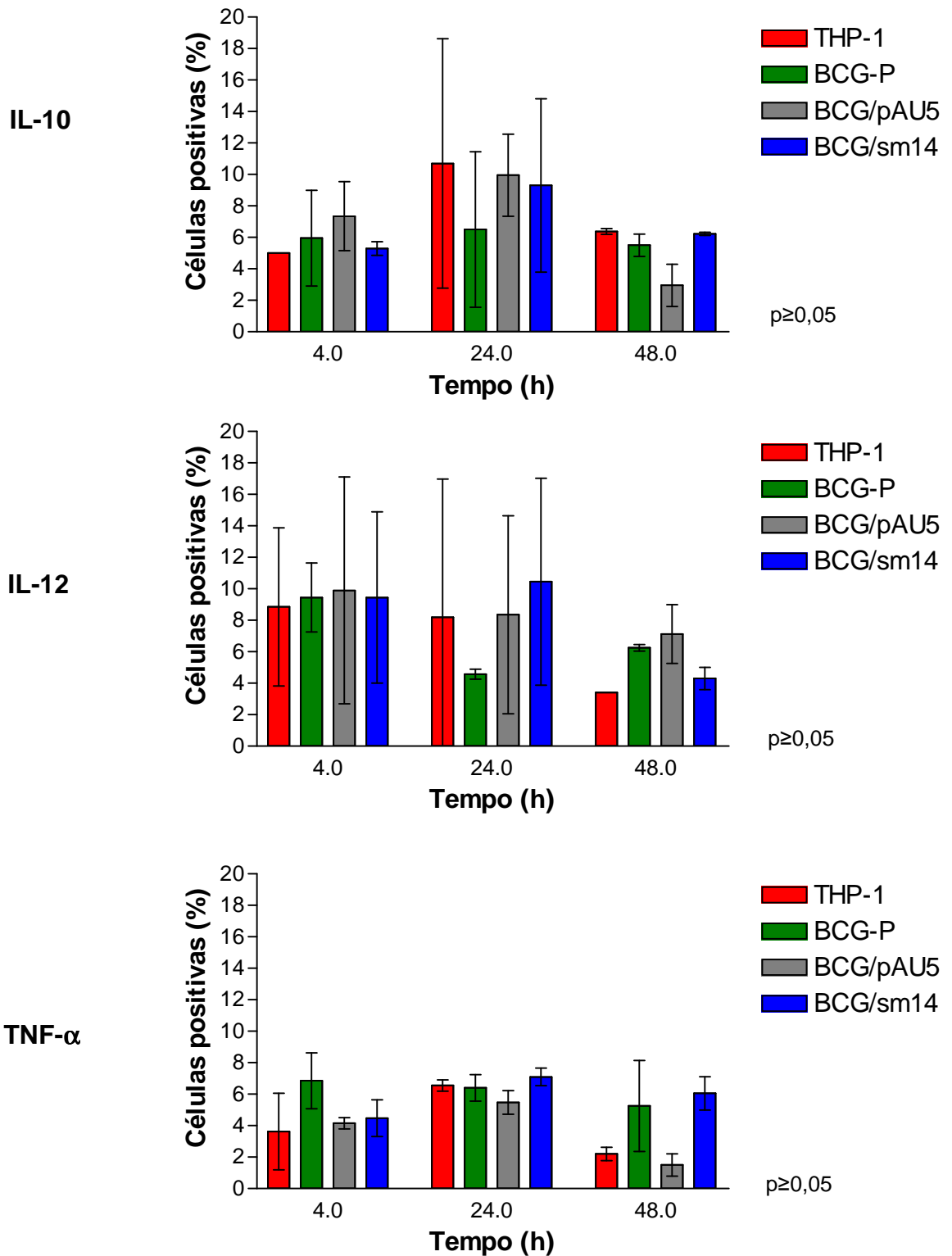


Figura 4.8 Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por imunocitoquímica (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

4.8 Avaliação das citocinas a partir da infecção do BCG/*sm14* e BCGs controles em células THP-1 por Citometria de Fluxo

Para a detecção intracelular das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α produzidas pela célula THP-1 e pela infecção com BCG/*sm14*, BCG-P ou BCG/pAU5 em células THP-1 pela técnica de citometria de fluxo, inicialmente foi determinada a região de análise a partir da leitura de uma amostra das células THP-1 incubada a 37°C em ambiente com 5% CO₂ por 4 horas, sendo comparada a relação tamanho/granulosidade, objetivando excluir tanto restos celulares quanto grumos celulares (Figura 4.8).

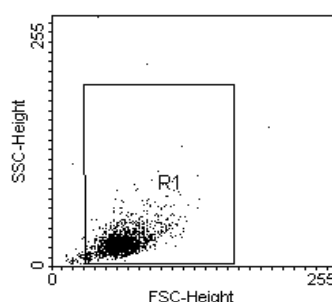


Figura 4.9 Determinação da região de análise das células THP-1 mantidas em cultivo celular. A região de análise (R1) foi determinada excluindo-se os restos celulares. Pode-se observar uma grande variabilidade quanto ao tamanho das células, visto se tratar de células em diferenciação.

Os resultados estão expressos nas figuras 4.9 a 4.12, mostrando a média de três experimentos, sendo evidenciado o desvio padrão pela barra de erro. Na detecção da produção de citocinas pelas células THP-1 sem estímulos, observou-se que a citocina IL-10 foi expressa por 3,2%, 8,1% e 11,4% das células THP-1, sendo que 2,7%, 4,6% e 8,1% das células THP-1 produziram a citocina IL-12 e 3,0%, 5,9% e 5,4% das células THP-1 expressaram TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas.

A infecção com BCG-P em células THP-1 gerou durante os tempos de infecção, 3,3%, 6,9% e 13,4% de células produtoras de IL-10; 2,0%, 5,5% e 12,0% de células expressando IL-12 e 4,2%, 5,4% e 11,4% de células sintetizando TNF- α .

Na infecção com o controle BCG/pAU5 em células THP-1, 3,3%, 6,2% e 12,3% expressaram IL-10, na produção de IL-12 foram detectados 4,3%, 4,6% e 10,2% de células e 4,0%, 3,9% e 11,3% de células produziram TNF- α .

Durante a infecção do BCG/*sm14* em células THP-1, foram detectados 3,2%, 7,9% e 12,9% de células expressando IL-10; 3,1%, 4,8% e 9,0% de células produtoras de IL-12 e 2,7%, 3,4% e 11,4% de células fabricantes de TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente.

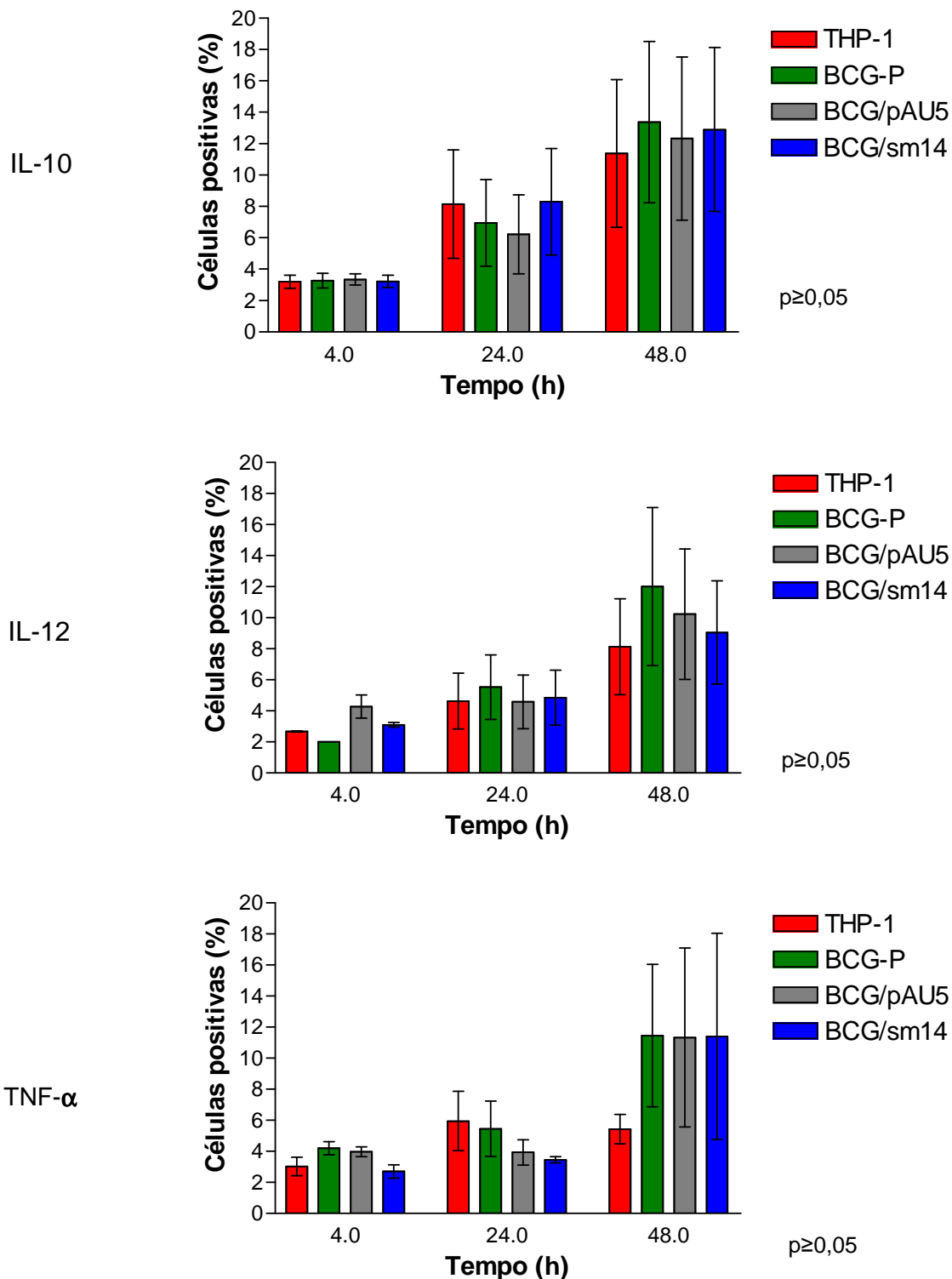


Figura 4.10: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 TNF- α e após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por citometria (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

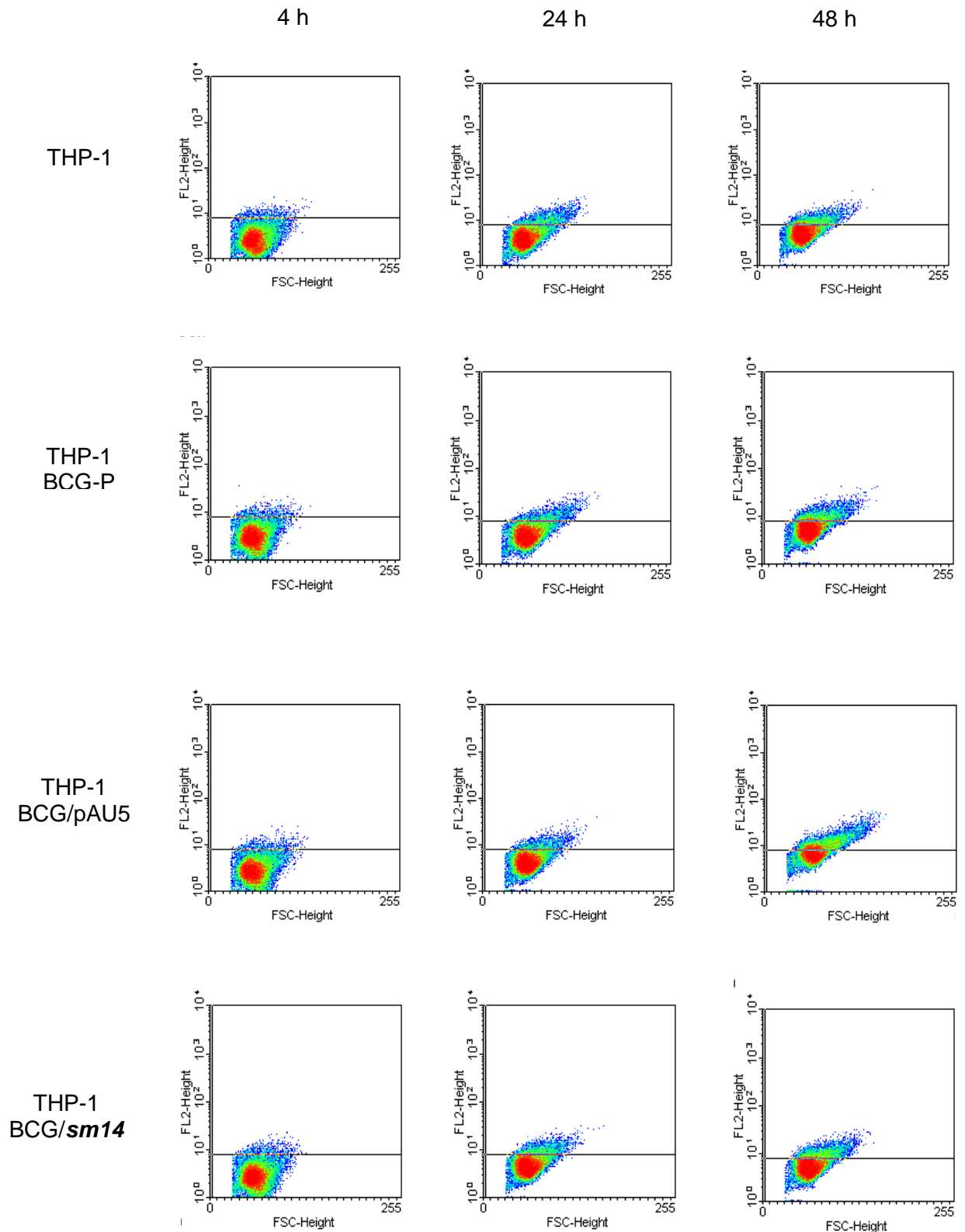


Figura 4.11: Gráfico tamanho (FSC) versus fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria (Experimento III).

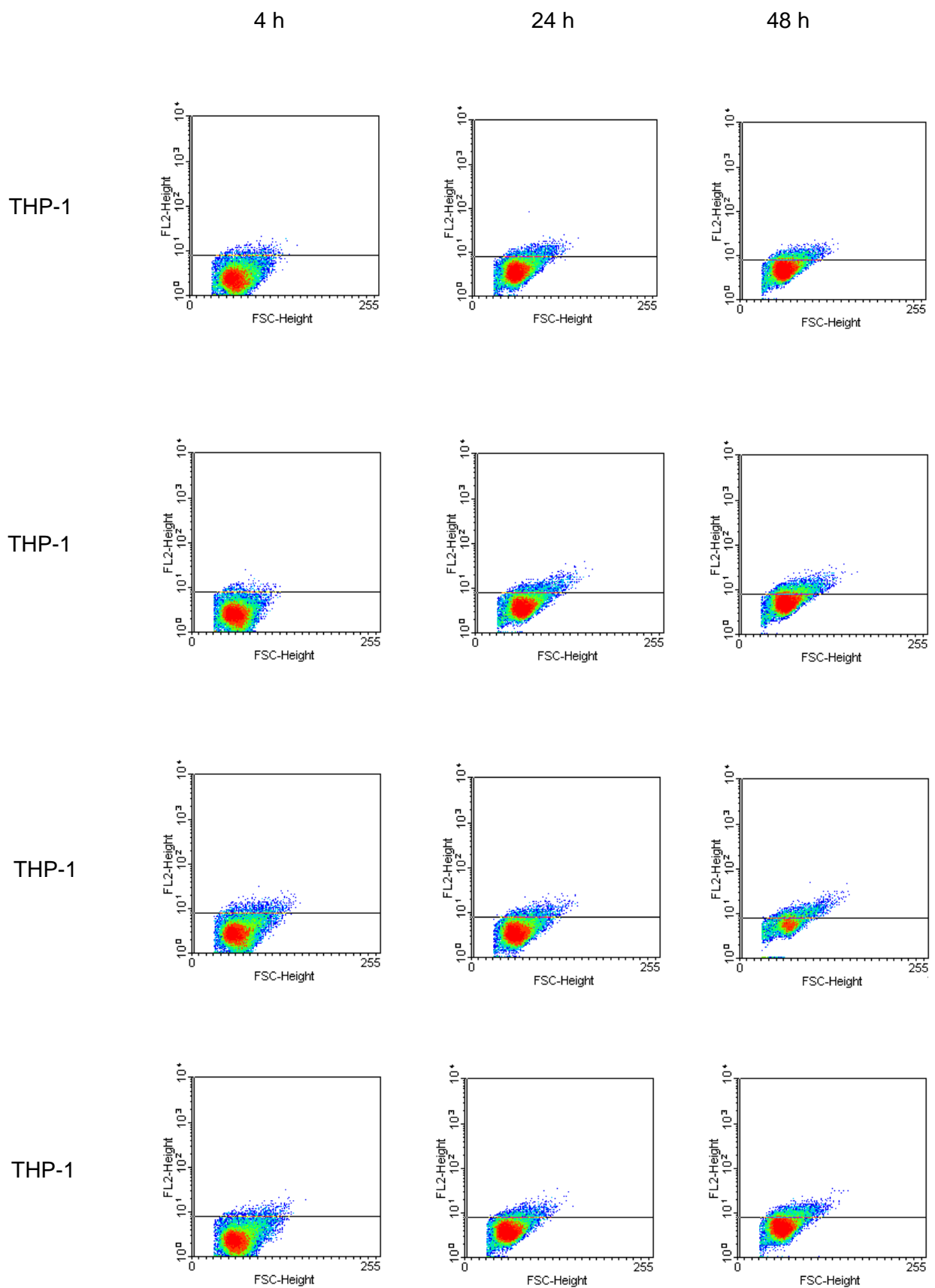


Figura 4.12: Gráfico tamanho (FSC) versus fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/sm14 e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por citometria (Experimento III).

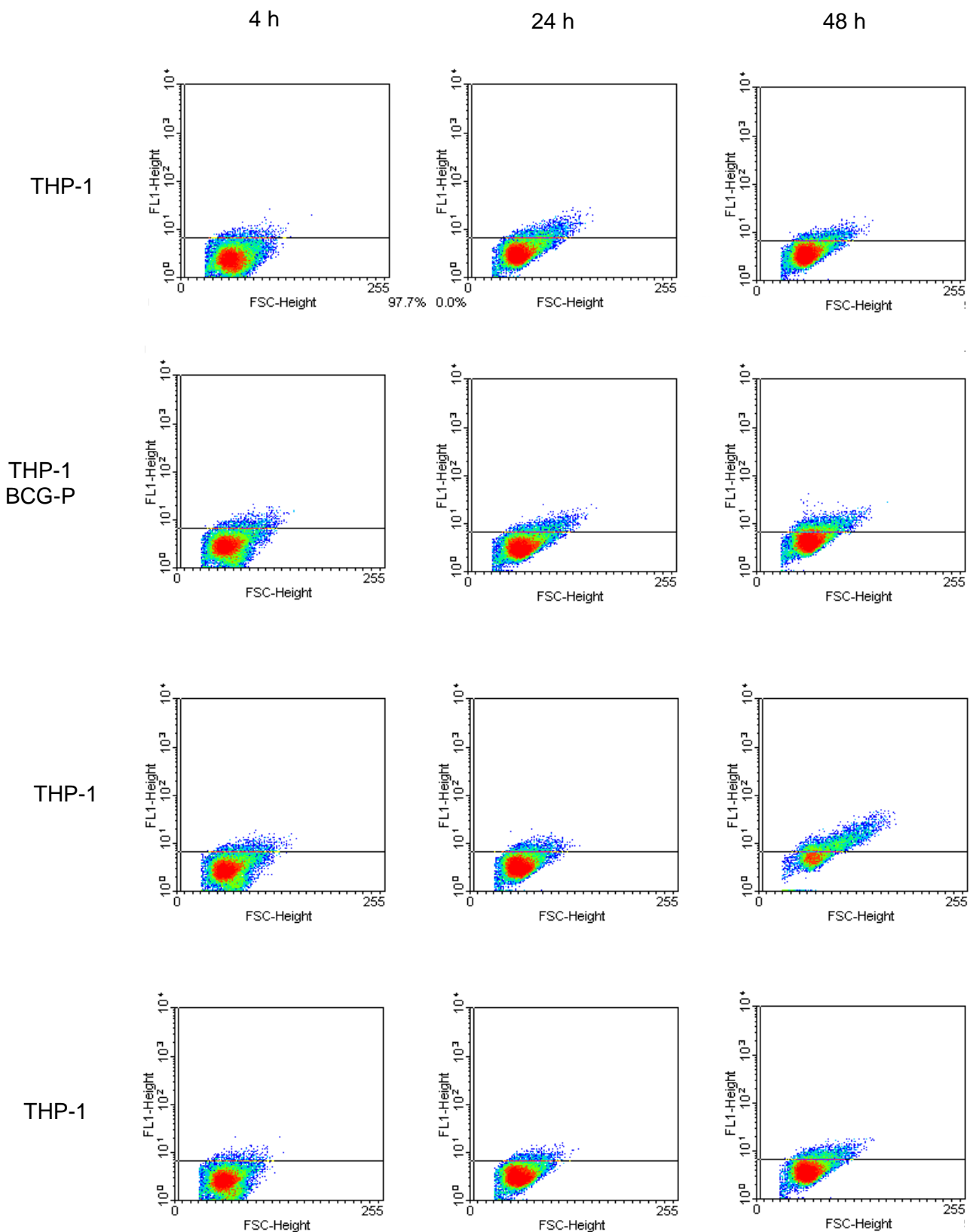


Figura 4.13: Gráfico tamanho (FSC) *versus* fluorescência (FL1 ou FL2) da avaliação de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por citometria (Experimento III).

4.9 Comparação entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo

As células THP-1 infectadas ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles foram avaliadas quanto à produção das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α durante os períodos de 4, 24 e 48 horas, pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo.

4.9.1 Detecção de IL-10

A detecção de células THP-1 produtoras de IL-10 a partir da infecção ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), estão apresentadas na figura 4.13. Nas células THP-1 não infectadas, observa-se uma variação entre 1,8% e 2,6% de células positivas na avaliação pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo nos tempos de 4 horas (5,0% e 3,2%, respectivamente) e 24 horas (8,1% e 10,7%, respectivamente), ocorrendo uma inversão na variação do número de células produtoras de IL-10, no período de 48 horas (6,4% e 11,4%, respectivamente).

Na infecção com BCG-P em células THP-1 revela-se que no período de 4 horas há variação do número de células positivas detectadas pelas duas técnicas (5,9% imunocitoquímica e 2,0% citometria). Já nos períodos de 24 e 48 horas evidencia-se uma variação de 1,0% (5,5% e 6,5%, respectivamente), sendo observado de forma similar às células THP-1 uma inversão entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (5,5% e 12,0%, respectivamente).

Na infecção com BCG/pAU5 em células THP-1 avista-se uma variação de 4,0% do número de células positivas (7,3% e 3,3%, respectivamente) em 4 horas de infecção. No tempo de 24 horas, mantém-se a variação (9,9% e 6,2% respectivamente). No entanto, no tempo de 48 horas de infecção, a porcentagem de células expressando IL-10 detectada pela técnica de imunocitoquímica diminui para 2,9% enquanto pela técnica de citometria de fluxo, aumenta praticamente quatro vezes em relação à porcentagem observada no tempo de 24 horas (12,3%).

Na infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, nos tempos de 4, 24 e 48 horas, avalia-se inicialmente uma variação de 2,1% na detecção de IL-10 pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (5,3% e 3,2%, respectivamente) no tempo de 4 horas. No tempo de 24 horas visualizamos uma pequena queda na variação dos valores obtidos entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria

(9,3% e 7,9% respectivamente). observa-se uma inversão do número de células positivas no tempo de 48 horas (6,2% e 12,9% respectivamente).

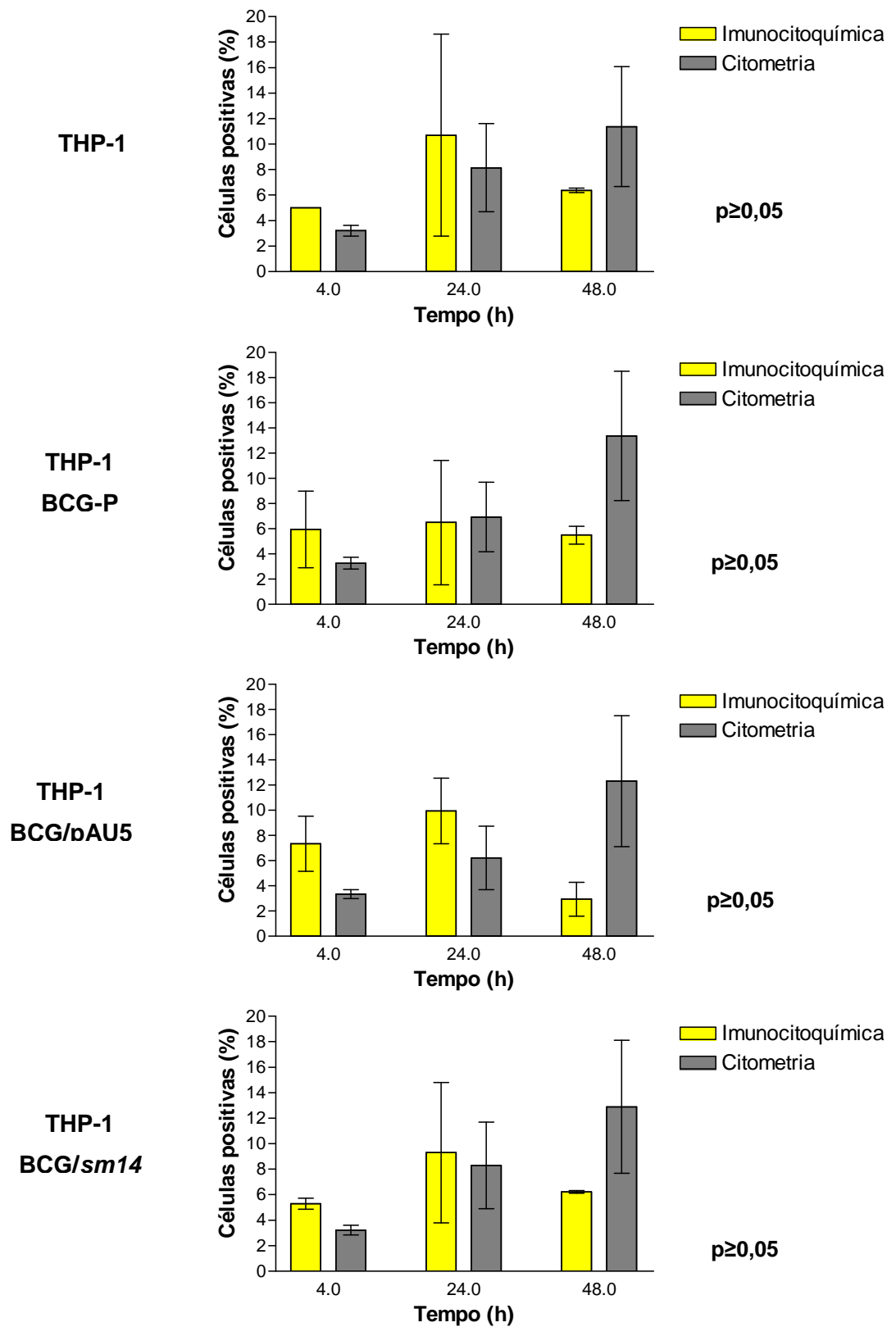


Figura 4.14: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por imunocytoquímica e citometria de fluxo (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

4.9.2 Detecção de IL-12

A detecção de células THP-1 produtoras de IL-12 a partir da infecção ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), estão apresentadas na figura 4.14. Nas células THP-1 não infectadas, observa-se uma variação na detecção de células positivas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (8,8% e 2,7%, respectivamente). No período de 24 horas, mantém-se praticamente inalterado o número de células produtoras de IL-12 avaliado pela técnica de imunocitoquímica (8,2%) e um aumento na porcentagem de células positivas avaliados pela técnica de citometria de fluxo (4,6%). No tempo de 48 horas as porcentagens de células THP-1 positivas foram de 3,4% e 8,1% nas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

Na infecção com BCG em células THP-1 revela-se que no período de 4 horas, os valores obtidos foram de 9,4% e 2,0% de células positivas identificadas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria, respectivamente. No período de 24 horas evidencia-se um decréscimo de 4,8% de células avaliadas pela técnica de imunocitoquímica (4,6%) e um aumento de 3,5% de células avaliadas pela técnica de citometria de fluxo. A mesma tendência de inversão na variação dos valores obtidos pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria no tempo de 48 horas após infecção é evidenciado (6,1% e 12,0%, respectivamente).

Na infecção com BCG/pAU5 em células THP-1 avista-se uma variação do número de células positivas detectadas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria no tempo de 4 horas (9,9% e 4,3%). Após 24 horas de infecção, ocorre uma diminuição de 1,6% do número de células positivas determinadas pela técnica de imunocitoquímica e aumento de 0,3% de células positivas avaliadas pela técnica de citometria. Já no tempo de 48 horas de infecção, a porcentagem de células expressando IL-12 detectada pela técnica de imunocitoquímica diminuiu para 7,1% e pela técnica de citometria de fluxo a porcentagem de células positivas aumentou para 10,2%.

Na infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, observa-se uma variação de mais de 6,0% na detecção de IL-12 pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (9,4% e 3,1%, respectivamente) no tempo de 4 horas. No tempo de 24 horas há um aumento de 1,0% no número de células positivas detectadas pela técnica de imunocitoquímica (10,4%) semelhante ao aumento de 1,7% detectado pela técnica de citometria de fluxo (4,8%). Em 48 horas de infecção, foram

detectados 4,3% e 9,0% de células produtoras de IL-10 pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

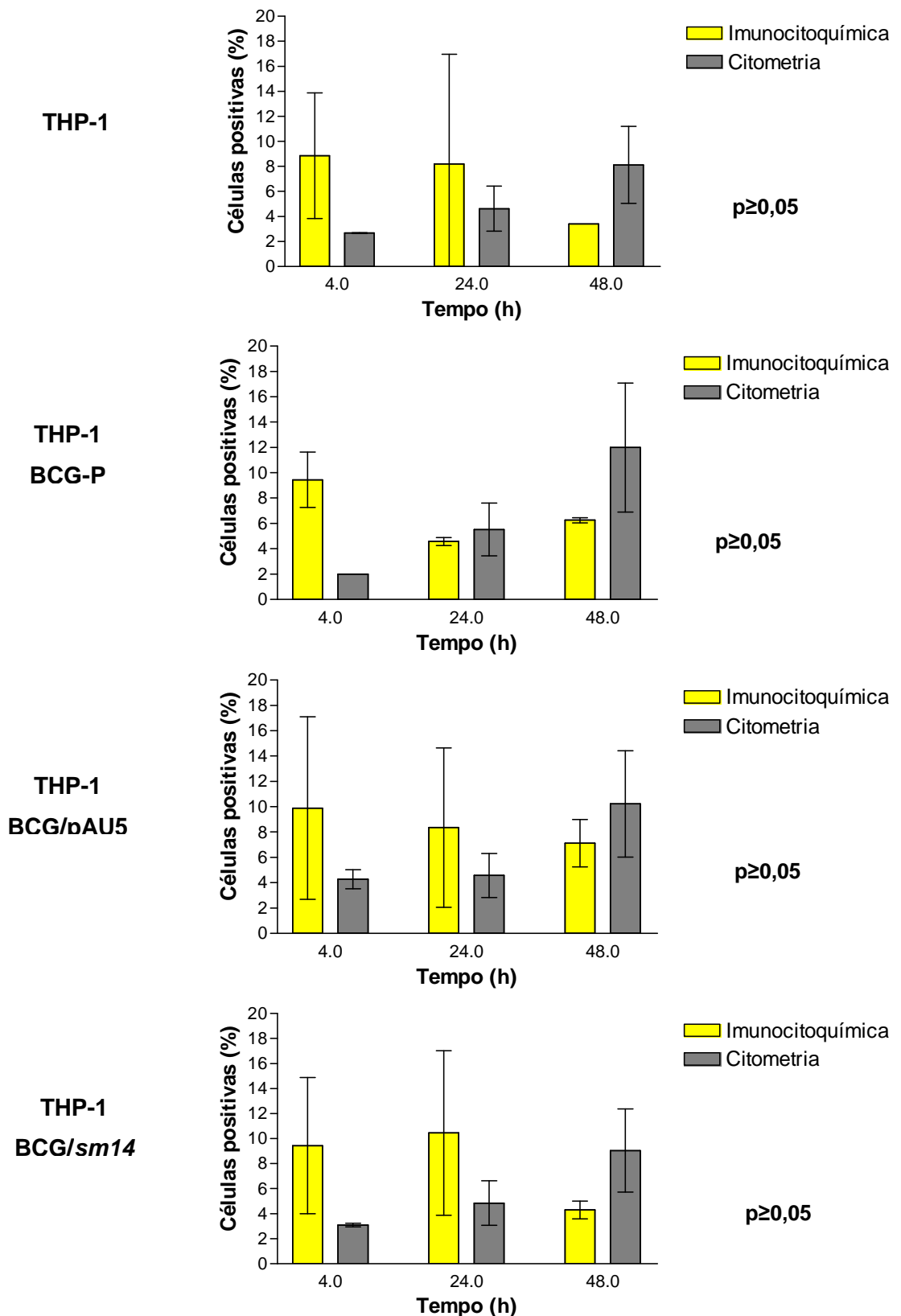


Figura 4.15: Percentagem de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

4.9.3 Detecção de TNF- α

A detecção de células THP-1 produtoras de TNF- α a partir da infecção ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), estão apresentadas na figura 4.15. Nas células THP-1 não infectadas, detecta-se no período de 4 horas os valores de 3,6% e 3,0% de células positivas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente. No tempo de 24 horas, ocorre um aumento do número de células produtoras de IL-12 avaliado tanto pela técnica de imunocitoquímica (6,5%) como pela técnica de citometria de fluxo (5,9%). No tempo de 48 horas as porcentagens de células THP-1 positivas foram de 2,2% e 5,4% nas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

Na infecção com BCG em células THP-1 revela-se que no período de 4 horas os valores detectados de células positivas pelas duas técnicas foram de 6,8% pela técnica de imunocitoquímica e 3,0% pela técnica de citometria de fluxo. Já nos períodos de 24 e 48 horas evidenciam-se 6,4% e 5,2%, respectivamente, de células positivas na leitura pela técnica de imunocitoquímica. Nesses mesmos períodos, os valores da leitura pela técnica de citometria de fluxo os valores de células produtoras de TNF- α foram semelhantes (5,9% e 5,4% respectivamente).

Na infecção com BCG/pAU5 em células THP-1 avistam-se os valores de 4,1% e 4,0% de células positivas em 4 horas de infecção pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente. No tempo de 24 horas, há um aumento do número de células expressando TNF- α detectadas pela técnica de imunocitoquímica enquanto pela citometria de fluxo o valor de células positivas mantém-se inalterado (5,5% e 3,9%, respectivamente). Já no tempo de 48 horas de infecção, a porcentagem de células expressando TNF- α detectada pela técnica de imunocitoquímica diminui para 1,5% e na técnica de citometria de fluxo aumenta consideravelmente em relação à porcentagem observada nos tempos de 4 e 24 horas (11,3%).

Na infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, nos tempos de 4, 24 e 48 horas, observa-se inicialmente os valores de 4,5% e 3,1% de células produtoras de TNF- α identificadas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo no tempo de 4 horas de infecção. No tempo de 24 horas há um aumento de células positivas detectadas em ambas as técnicas (7,1% e 4,8% respectivamente). Em 48 horas de infecção, foram detectadas 6,0% e 9,0% de células produtoras de TNF- α pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

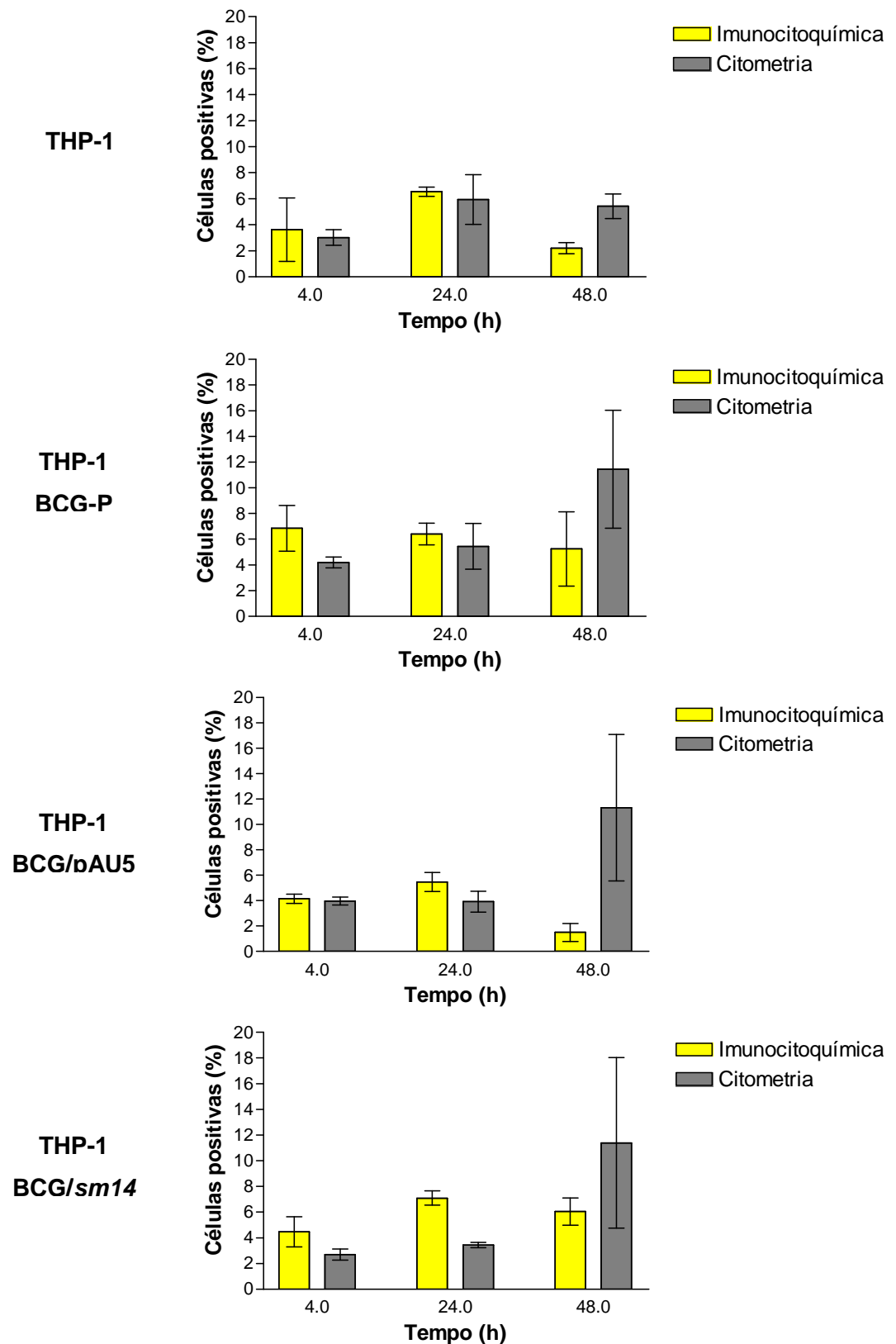


Figura 4.16: Percentagem de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

Os resultados obtidos por ambas as técnicas, apesar de divergentes entre si, não permitiram identificar diferenças no perfil de citocinas fabricadas pelas células THP-1 infectadas pelo BCG/*sm14* e pelos BCGs controles.

5. DISCUSSÃO

Devemos considerar alguns pontos importantes para se estudar a resposta imune desencadeada por protótipos vacinais, bem como sua eficácia. Dentre eles, podemos indicar a impossibilidade de se realizar experimentos em seres humanos sem prévios estudos *in vitro* em células humanas e/ou de animais e *in vivo* em animais de experimentação, apesar de sabermos que estes não reproduzem fielmente toda a gama de indução da resposta imune observado no homem (Metz *et al* 2002). Outras questões sobre o uso de animais em experimentação envolvem o benefício potencial contraposto ao sofrimento animal, aspectos legais, morais e éticos. Por estas razões um grande esforço vem sendo realizado na busca de métodos alternativos que sejam capazes de substituir, diminuir ou refinar os métodos de utilização de animais em experimentação, conforme descrito na teoria dos “3 Rs” – *Replacement* (substituição), *Refinement* (refinamento) e *Reduction* (redução) - descrita por Russell e Burch em 1959 (Dellepiane, Griffiths & Milstien 2000, Metz *et al.* 2002, Presgrave 2003).

A grande pressão internacional sobre as indústrias de fármacos, cosméticos e imunobiológicos que são grandes usuárias de animais no desenvolvimento, produção e testes de eficácia e segurança de produtos no sentido de buscarem a validação e aplicação de novas técnicas baseadas nos 3Rs, levou a criação de órgãos como o *Fund for Replacement of Animal Medical Experiments* (FRAME) que, desde 1983, edita uma revista internacional intitulada *Alternatives to Laboratory Animals* (ATLA). Em 1994, foi inaugurado o Centro Europeu para a validação de métodos alternativos (*European Centre for the Validation of Alternative Methods* - ECVAM). Outras instituições, como *Cosmetic, Toiletries and Frangrance Association* (CTFA), *Interagency Regulatory Alternatives Group* (IRAG), *Food and Drug Administration* - EUA (FDA) também atuam nos estudos de relevância e confiabilidade de propostas alternativas, pela pesquisa dos métodos atualmente utilizados e o desenvolvimento e validação de novos testes, para que os produtos químicos e os produtos de várias espécies possam ser manufaturados de forma mais segura e econômica, visando reduzir o uso e minimizar o sofrimento dos animais (Balls 2002, Hendriksen 2005).

Um dos métodos alternativos para substituição ou pelo menos diminuição do uso de animais nas fases de desenvolvimento, produção e testes de algumas vacinas é a adoção de sistemas de ensaios *in vitro*, dentre os quais podemos

destacar o uso de cultura de células (Metz *et al* 2002, Presgrave 2002, Presgrave 2003). A principal vantagem da utilização *in vitro* de cultivos celulares é o controle do ambiente de cultura, podendo-se controlar condições físico-químicas (pH, temperatura, pressão osmótica, níveis de oxigênio (O₂) e CO₂, tensão superficial) e fisiológicas (hormônios, fatores de crescimento, densidade celular), que podem ser mantidas relativamente constantes (Doyle & Griffiths 1998, Freshney 2000a). Outras vantagens relevantes são: a homogeneidade das células em cultivo em relação à morfologia e especificidades uniformes, podendo com facilidade obter um número elevado de réplicas idênticas, superando assim o problema de heterogeneidade de amostras, reduzindo a variação e o custo dos experimentos, possibilitando a realização de múltiplos testes com muitas variáveis (Doyle & Griffiths 1998, Freshney 2000a).

A técnica de cultura de células integrada com sistemas computacionais e a hierarquização de métodos podem ser ferramentas importantes para etapas do desenvolvimento de protótipos vacinais (Figura 5.1), sendo utilizada principalmente para procedimentos de seleção (*screening*) de vacinas candidatas na fase pré-clínica (Henriques & Sampaio 2002, Larsen 2005).

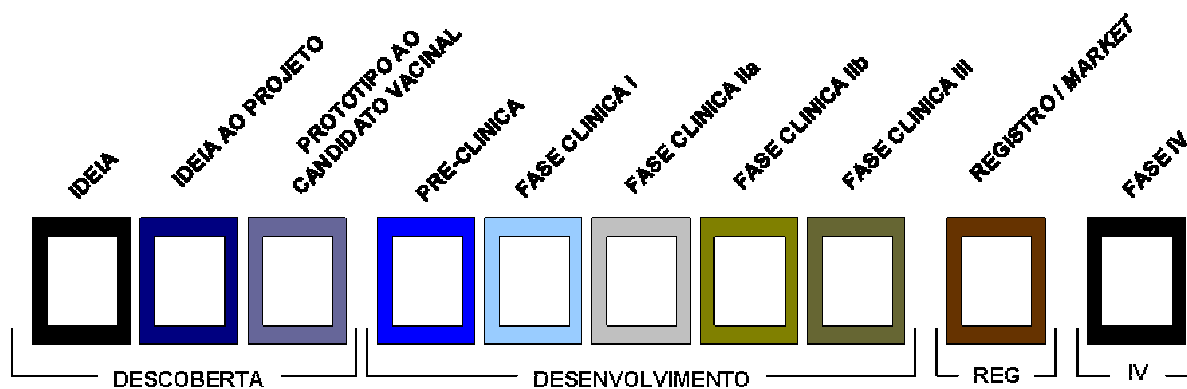


Figura 5.1: Modelo esquemático das etapas necessárias para implantação de novos fármacos e imunobiológicos (Adaptado de Larsen 2005).

Este estudo visou o desenvolvimento de um protocolo para a seleção de protótipos vacinais utilizando como modelo *M. bovis* BCG sub-cepa Pasteur expressando o antígeno Sm14 de *Schistosoma mansoni* e a linhagem de monócitos humanos THP-1 como substrato celular. Contudo, a eficiência da resposta imune induzida por BCGs recombinantes é dependente da capacidade de expressão da proteína heteróloga, uma vez que essa expressão pode interferir na

ativação celular. Assim, confirmamos a expressão da proteína Sm14 por todos os clones do protótipo vacinal BCG/*sm14*, e nossos resultados corroboram com relatos anteriores Argondizzo (2005), utilizando o mesmo sistema de expressão. Desta forma, assumimos que todos os recombinantes BCG/*sm14* estavam expressando a proteína de interesse em quantidade suficiente para o prosseguimento dos experimentos de infecção com os protótipos vacinais em linhagens monocíticas.

Para a realização dos ensaios de infecção de células THP-1 com o BCG/*sm14*, foi necessário determinar a MOI capaz de induzir a melhor dose resposta para a expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α . Assim sendo, foram avaliadas três diferentes relações, 5, 10 e 50 BCGs para cada célula THP-1. Os resultados obtidos mostram que o fato da MOI de 50 BCG:THP-1 não ter estimulado adequadamente a expressão de citocinas, sugere que esta concentração de BCG promove perda da viabilidade de células THP-1 (Hassan *et al* 2006). Por outro lado, a MOI de 10 de BCG/THP-1 estimula uma maior porcentagem de células produtoras de IL-10 e IL-12, tendo sido considerada, portanto a melhor dose-resposta para a síntese das citocinas neste estudo. Entretanto, ao contrário do observado por Oliveira, Charlab & Pessolani (2001), que na análise das MOI de 1, 10 e 100 de BCG e *M. leprae* para cada célula THP-1, concluíram que a relação de 10:1 de micobactérias-célula THP-1 induz uma maior produção de TNF- α , no presente trabalho a MOI de 5 BCGs apresentou o melhor resultado com relação às células produtoras de TNF- α . Atkinson e colaboradores (2000), realizaram de forma semelhante uma pesquisa do perfil de citocinas (IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α) expressas por linhagem primária de macrófagos humanos infectadas com MOI de 0,2, 1 e 5 BCGs, concluindo que a MOI de 5 BCG/célula induz de forma eficiente a expressão das citocinas IL-10 e TNF- α por macrófagos infectados. Devido a divergências entre os resultados obtidos neste trabalho e os resultados relatados na literatura para determinar a relação padrão para avaliação de citocinas a partir da interação BCG-macrófago, e como o maior percentual de células expressando IL-10 e IL-12 foi atingido com a relação de 10 BCG para cada célula THP-1, optamos por usar esta proporção nos ensaios de imunocitoquímica e citometria para a quantificação das células produtoras de citocinas infectadas com o protótipo vacinal BCG/*sm14*.

Dentre os requerimentos para se determinar o sucesso de protótipos vacinais está a indução e ativação das APCs, que irão realizar o processamento de antígenos, a expressão de fatores co-estimulatórios, secreção de citocinas e a

apresentação antigênica às células T, tornando-se essenciais para o desencadeamento da resposta imune (Ada 2004). Neste contexto, utilizamos uma linhagem de monócitos humanos como modelo para infecção, recuperação e análise do perfil de citocinas (IL-10, IL-12 e TNF- α) expressas em células THP-1 após infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14*. Vários autores têm utilizado esta linhagem celular como modelo de averiguação do perfil de ativação celular em monócitos (Diaz-Silvestre *et al.* 2005, Xia *et al.* 2005, Ciabattini *et al.* 2006) ou células maduras – macrófagos (Oliveira, Charlab & Pessolani 2001, Lewis *et al.* 2003, Theus, Cave & Eisenach 2004, Theus, Cave & Eisenach 2005, Hasan *et al.* 2006).

Da mesma forma, autores como Takahashi (2003), Ada (2004) e Plotkin (2005a), destacam que o reconhecimento e a ativação das APCs podem ser considerados como etapas relevantes para avaliação de protótipos vacinais e para o sucesso vacinal. Os monócitos são importantes células efetoras capazes de responder rapidamente a estímulos imunes de diferentes formas, como produção de proteínas inflamatórias, expressão de moléculas de adesão em sua superfície, ativação e diferenciação em macrófagos. Neste contexto, utilizamos a cintilografia para o acompanhamento da proliferação da célula THP-1 infectada ou não com o protótipo vacinal BCG/*sm14*, com a amostra vacinal de BCG Pasteur e com a construção BCG/pAU5. A medição de partículas beta emitidas pela timidina-H³ captada pelas células THP-1, nos permite determinar a capacidade do protótipo vacinal de ativar as células THP-1 e modificar seu estado de célula jovem, indiferenciada (monócitos) e transformá-las em células ativadas (macrófagos), a partir da redução de sua capacidade de replicação (Bennett *et al.* 1993). Nas condições avaliadas, nossos resultados mostram que as amostras de BCGs utilizadas para infectar as células THP-1 foram capazes de estimular esta linhagem, não sendo evidenciada diferenças no perfil de ativação induzido pela amostra vacinal de BCG, o protótipo vacinal BCG/*sm14* e a construção BCG/pAU5. Como a ativação dos monócitos/macrófagos não é específica, não podemos determinar o “quanto” a proteína Sm14 foi responsável pela diferenciação celular. Experimentos futuros devem ser desenhados para determinar neste sistema a capacidade de ativação da proteína Sm14.

Além da avaliação da proliferação de células THP-1, autores como Medeiros (2001), Varaldo e colaboradores (2004) e Argondizzo (2005), assinalaram a necessidade de avaliarmos a capacidade de infecção e a manutenção do

crescimento intracelular de protótipos vacinais baseados na tecnologia do BCG recombinante em culturas de monócito/macrófago. Com esse objetivo, montamos um experimento para acompanhar a cinética de crescimento do BCG/*sm14*, em paralelo com os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5) empregados na infecção e na recuperação em células THP-1, nos tempos de 4, 24 e 48 horas. Nossos dados assemelham-se com os descritos na literatura (Medeiros 2001, Varaldo *et al.* 2004, Argondizzo 2005), não detectando diferenças significativas na capacidade de infecção e de crescimento intracelular entre as amostras de BCG testadas, sendo visualizada uma pequena redução do número de UFC recuperadas entre o período basal de 4 horas e após 24 e 48 horas. Podemos concluir que nas condições estudadas o protótipo vacinal BCG/*sm14* possui a mesma aptidão de infecção e persistência intracelular da amostra vacinal BCG Pasteur e da construção BCG/pAU5, favorecendo seu uso como protótipo vacinal.

Devido à problemática da estabilidade de plasmídeos recombinantes, a qual interfere fundamentalmente com a expressão da proteína heteróloga por vacinas recombinantes baseadas em vetores vivos atenuados e, evidentemente, na plataforma do BCG recombinante (Haeseleer 1994), realizou-se a avaliação da estabilidade funcional do BCG transformado com o plasmídeo pAU5-*sm14* (BCG/*sm14*). A capacidade dos BCGs recombinantes (BCG/*sm14* e BCG/pAU5) de manterem o fenótipo de resistência para canamicina (Kan), mostra que não há diferença expressiva entre os BCGs recombinantes cultivados nos meios seletivo (7H11+Kan) e não seletivo (7H11). Esses resultados confirmam os dados obtidos no trabalho realizado por Argondizzo (2005) e são extremamente importantes para o desenvolvimento de vacinas baseada na utilização do BCG como vetor vivo atenuado de imunógenos, porque demonstram que BCGs recombinantes permanecem estáveis e expressando continuamente o gene inserido mesmo no ambiente intracelular de macrófagos (Medeiros 2001, Argondizzo 2005).

Recentemente Chabalgoity e colaboradores (2007) descrevem a importância da indução de citocinas para o desenvolvimento de uma resposta protetora para o desenho de vacinas. Visando obter dados preliminares que permitam demonstrar a viabilidade da seleção *in vitro* de vacinas, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar a possibilidade de se determinar o perfil de citocinas induzidas por protótipos vacinais em linhagem de células humanas.

As citocinas são consistentemente avaliadas e quantificadas durante testes pré-clínicos e clínicos, como marcadores de ativação e/ou supressão da resposta

imune induzida pelos protótipos vacinais. Nessa conjuntura, foi realizada a análise das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α expressas pela infecção com protótipo vacinal BCG/*sm14*, com a amostra vacinal de BCG Pasteur e com a construção BCG/pAU5 em células THP-1. Para a detecção intracelular de citocinas em células, utilizamos a técnica de imunocitoquímica (Santiago 2003) e a técnica de citometria (Kallás 1999).

A produção de citocinas induzidas pelo BCG em células mononucleares periféricas humanas segue uma cinética (Sander *et al.* 1995) que varia de indivíduo para indivíduo e tende a ser mediada por um perfil Th1 nos primeiros 5 a 7 dias, regredindo e assumindo perfil Th2 posteriormente (9 a 12 dias após a infecção). Contudo, estes autores não diferenciaram a produção de IL-10 pelos monócitos/macrófagos e linfócitos T. Mas a detecção de IL-10 foi identificada somente após 10 dias de infecção, o que contradiz nossos resultados e os de Atkinson e colaboradores (2000). Uma possível explicação pode estar na metodologia utilizada, na utilização de células não estimuladas e na obtenção destas células de indivíduos não expostos a micobactérias ou não vacinados pelo BCG. Sander e colaboradores (1995) utilizaram a técnica de imunofluorescência indireta e observação microscópica, enquanto Atkinson e colaboradores (2000) utilizaram macrófagos derivados de monócitos humanos. Em nosso sistema, a secreção de IL-10 é evidenciada em células THP-1 sem prévia ativação após 4 horas de incubação, da mesma forma após 24 horas observamos resultados similares aos descritos por Atkinson e colaboradores (2000) em macrófagos derivados de monócitos (*Monocyte-derived macrophage* – MDM). De modo interessante estes autores evidenciaram uma grande variabilidade na secreção de citocinas por MDM humanos, neste caso variando de 1,0 a 7,0% de células positivas para IL-10 após 20 horas de infecção. Observamos uma diferença entre nossos resultados obtidos pelas duas técnicas (imunocitoquímica e citometria), variando de 6,4% a 11,4%, respectivamente.

Quanto a secreção de IL-12 evidenciamos que as células THP-1 produzem, mesmo sem estímulos valores entre 2,7% e 8,8%, contudo Ciabattini e colaboradores (2006) descrevem a expressão de níveis basais de IL-12 em células mononucleares humanas (Ciabattini *et al.* 2006; 1 a 3%). O perfil de expressão de IL-12 expresso pelas células THP-1 não pode ser claramente identificado pela discrepância entre as duas metodologias utilizadas por nós, ou seja, a técnica de imunocitoquímica mostrou que 8,8% das células expressavam IL-12, enquanto que por citometria identificamos 2,7% de células positivas. Contudo após infecção pelo BCG foi observado um percentual que variou de 4,6% a 6,5% após 24 horas e 6,1 a

12,0% após 48 horas, indicando um aumento progressivo de células produtoras de IL-12. A infecção pelo BCG/sm14 também foi capaz de induzir percentuais semelhantes de células produtoras de IL-12.

Independente da metodologia utilizada, as infecções por BCG e BCG/sm14 induziram um percentual ligeiramente maior de células expressando IL-10 do que IL-12. Este perfil parece ser característico das células THP-1, e a infecção com BCG/sm14 não foi capaz de modificar esse perfil.

Uma análise mais longa, estudando a associação entre o BCG e as células THP-1 pode responder se a indução tardia destas citocinas pode ser modificada, visto não termos evidenciado esta mudança em culturas de até dois dias de interação.

Uma das maiores dificuldades para o desenvolvimento de uma vacina contra esquistossomose está a complexidade da interação entre patógeno e hospedeiro. As cercárias, os vermes adultos e os diferentes estágios de desenvolvimento entre estas formas apresentam mecanismos que permitem a estes evadir de uma resposta imune efetiva, incluindo a produção de moléculas antiinflamatórias, a inibição da migração de células apresentadoras de antígeno e a cobertura da superfície do parasito com moléculas do hospedeiro (Lebens *et al.* 2004). Outro ponto importante é o pouco entendimento da natureza da resposta imune protetora (Wynn & Hoffmann 2000, Pearce & McDonald 2002, Lebens *et al.* 2004).

Alguns autores demonstraram que em modelo murino e humano, a resposta Th2 seria eficaz para o controle da doença, ao passo que estudos de vacinação em camundongos indicam que uma imunidade mediada por células T, envolvendo a produção de IFN- γ e IL-12 (Th1), poderia ser melhor (Capron *et al.* 1995, Wynn & Hoffmann 2000). No entanto, a questão da resposta imune efetiva contra esquistossomose ainda é bastante polêmica. Existem autores que acreditam ser a resposta imune humoral a mais eficaz para a proteção de humanos e outros defendem a resposta imune celular, mas existem, também, aqueles que acreditam que ambas as respostas humoral e celular são imprescindíveis para a proteção (Brito *et al.* 2000, Ribeiro de Jesus *et al.* 2000, Varaldo *et al.* 2004). Estudos imunológicos em pessoas residentes em zonas endêmicas para esquistossomose, demonstraram altos níveis de IgE e IFN- γ , sugerindo a participação das respostas celular e humoral nos mecanismos imunológicos de resistência natural a reinfecção de *S. mansoni* (Ribeiro de Jesus *et al.* 2000). O estudo realizado por Brito e colaboradores (2000) na avaliação das respostas imunes frente à proteína Sm14 em

grupos de pessoas residentes em zonas endêmicas de esquistossomose e de pacientes crônicos e tratados para a doença, em relação à avaliação das citocinas produzidas, os níveis de IL-5 e IL-10, conhecidas como citocinas Th2, não foram estatisticamente diferentes em nenhum dos grupos estudados. Já o IFN- γ e TNF- α foram produzidos em quantidades significativamente maiores pelas PBMC de indivíduos normais endêmicos. Adicionalmente demonstraram que a IL-10 é uma importante citocina moduladora de respostas de células T na esquistossomose crônica, enquanto que a proliferação de linfócitos no grupo resistente não infectado é dependente de IFN- γ . Estes resultados sugerem que a resposta imune do tipo Th1 induzida em indivíduos normais endêmicos para um antígeno de esquistossomo poderia estar associada com resistência à infecção e também destacou a importância da Sm14 como potencial candidato vacinal contra esquistossomose humana (Brito *et al.* 2000).

Uma possível justificativa para nossos resultados seria o fato da proteína Sm14 ser expressa no citoplasma do BCG aliado a persistência intracelular BCG/*sm14* em células THP-1, não estando assim, disponível para a estimulação dos macrófagos. Nesse caso a apresentação do antígeno de interesse (Sm14) só acontece quando a Sm14 é liberada do fagossomo após a destruição do BCG (Kaufmann & Hess 1999). Dados obtidos por Varaldo e colaboradores (2004) e Argondizzo (2005), demonstram que não foram detectados anticorpos anti-Sm14 em camundongos imunizados com cepas recombinantes de BCG/*sm14*. Todavia vários autores já demonstraram, não somente a expressão de diversos antígenos no citoplasma de BCG recombinantes, como também conseguiram induzir uma eficiente resposta imune humoral, independente do sistema de apresentação no qual o antígeno alvo estava sendo expresso (Aldovini & Young 1991, Murray *et al.* 1992, Stover *et al.* 1991, Kremer *et al.* 1998, Hayward *et al.* 1999; da Cruz *et al.* 2002).

Os resultados obtidos não foram capazes de diferenciar o protótipo vacinal BCG/*sm14*, da amostra vacinal BCG Pasteur e da construção BCG/pAU5, não servindo, portanto, como comparativo aos trabalhos descritos para a determinação do perfil de citocinas obtidas nas respostas imunes contra o BCG e contra a proteína Sm14.

6. CONCLUSÕES

- Desenvolveu-se um protocolo de infecção com BCGs em células THP-1, determinando que a melhor relação foi de 10 BCGs para cada célula THP-1.
- A expressão da proteína recombinante Sm14 sintetizada pelos clones de BCG/*sm14* demonstrou-se satisfatória para realização dos experimentos de infecção em células THP-1
- O protótipo vacinal BCG/*sm14* manteve o mesmo grau de infecciosidade e persistência intracelular da sub-cepa vacinal BCG Pasteur.
- O protótipo vacinal BCG/*sm14* manteve a mesma capacidade de induzir a diferenciação e a maturação de macrófagos provenientes da linhagem de monócitos THP-1 que a sub-cepa vacinal BCG Pasteur.
- O protótipo vacinal BCG/*sm14* não foi capaz de modificar o perfil de IL-10, IL-12 e TNF- α induzido pela sub-cepa vacinal BCG Pasteur em células THP-1

7. PERSPECTIVAS

- Como a indução da resposta imune ao *Schistosoma mansoni* é preferencialmente induzida por resposta Th2 (aumento de IL-10 e diminuição de IL-12, IFN- γ e IL-2), a utilização do recombinante BCG/*sm14* como protótipo vacinal pode ser de relevância para a indução de resposta protetora para a esquistossomose, como para a tuberculose, visto que não houve diferença marcante na produção de IL-10 e/ou IL-12.
- Novos experimentos devem ser realizados para determinar o papel das células apresentadoras de antígenos na modulação de células T CD4 e CD8 visando um melhor entendimento da resposta imune adaptativa e de memória.
- A modulação das células apresentadoras de antígenos (monócitos, macrófagos, células dendríticas) pode direcionar a resposta imune a protótipos vacinais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK & Lichtman AH. **Imunologia celular e molecular**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005a. Cap.11: Citocinas. p. 251–282.

_____. **Imunologia celular e molecular**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005b. Cap.12: Imunidade inata. p. 283–306.

Ada G. The immunology of vaccination. **In:** Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines**. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2004. p. 31–46

_____. **Vaccines and vaccination**. *N Engl J Med*. 2001; 345 (14): 1042–1053

Al-Sherbiny M, Osman A, Barakat R, El Morshedy H, Bergquist R, Olds R. **In vitro cellular and humoral responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens**. *Acta Trop*. 2003; 88 (2): 117-130.

Aldovini A & Young RA. **Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-mv vaccines**. *Nature*. 1991; 351: 479–482

Amadori M, Ritelli M, Tagliabue S, Pacciarini ML. **Macrophage cell cultures for rapid isolation of intracellular bacteria: the *Mycobacterium bovis* model**. *Methods Mol Biol*. 2006; 345: 203–217

André FE. **Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises**. *Vaccine* 2003; 21: 593–595.

Argondizzo APC. **Construção do *M. bovis* BGC recombinante Sm14r e Avaliação da sua Capacidade Protetora contra Esquistossomose no Modelo Murino**. Rio de Janeiro; 2005. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] – FIOCRUZ

ATCC – *American type culture collection* **THP-1 Catalog Details: TIB-202** [online]. Manassas, EUA. 2006. [capturado em 10 de setembro de 2006]. Disponível em: <http://www.atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=TIB-202>

Atkinson S, Valadas E, Smith SM, Lukey PT, Dockrell HM. **Monocyte-derived macrophage cytokine responses induced by *M. bovis* BCG**. *Tuber Lung Dis*. 2000; 80 (4-5):197-207. Erratum in: *Tuber Lung Dis* 2000; 80 (6): 293.

Auwerx J. **The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation**. *Experimentia*. 1991; 47: 22–31.

Balls M. **Future Improvements: replacement *in vitro* methods**. *ILAR J*. 2002; 43 (Suppl): S69–S73

Bastos K.RB, Alvarez JM, Marinho CRF, Rizzo LV, D'Império Lima MR. **Macrophages from IL-12p40-deficient mice have a bias toward the M2 activation profile**. *J. Leukoc. Biol*. 2002; 71: 271–278

Bennett S, Por SB, Cooley MA, Breit SN. ***In vitro* replication dynamics of human culture-derived macrophages in a long term serum-free system**. *J Immunol*. 1993; 150 (6): 2364–2371

Berges C, Naujokat C, Tinapp S, Wieczorek H, Hoh A, Sadeghi M, Opelz G, Daniel V. **A cell line model for the differentiation of human dendritic cells.** Biochem Biophys Res Commun. 2005; 333 (3): 896–907

Beverley PCL. **Immunology of vaccination.** Br Med Bull. 2002; 62: 15-28

Bonah C. **The 'experimental stable' of the BCG vaccine: safety, efficacy, proof, and standards, 1921-1933.** Stud Hist Philos Biol Biomed Sci. 2005; 36(4): 696–721

Brito CF, Caldas IR, Coura Filho P, Correa-Oliveira R, Oliveira SC. **CD4+ T cells of schistosomiasis naturally resistant individuals living in an endemic area produce interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha in response to the recombinant 14KDA *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein.** Scand J Immunol. 2000; 51 (6): 595–601

Brusic V, August JT & Petrovsky N. **Information technologies for vaccine research.** Expert Rev Vaccines. 2005; 4 (3): 407–417

Campbell D, Mann BJ & Chadee K. **A subunit vaccine candidate region of the *Entamoeba histolytica* galactose-adherence lectin promotes interleukin-12 gene transcription and protein production in human macrophages.** Eur J Immunol. 2000; 30 (2): 423-30.

Capron A, Riveau G, Grzych JM, Boulanger D, Capron M, Pierce R. **Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomes: background and update.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 1995; 90 (2): 235–240

Carrel A. **On the permanent life of tissues outside the organism.** J. Exp. Med. 1912, 15: 516 – 528 *apud* Freshney RI. Introduction to basic principles. In: Masters JRW. **Animal cell culture: a practical approach.** 3rd ed. Oxford: Oxford University Press. 2000b: 1-18.

Chabalgoity JA, Baz A, Rial A, Grille S. **The relevance of cytokines for development of protective immunity and rational design of vaccines.** Cytokine Growth Factor Rev. 2007; 18 (1-2): 195–207

Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. **The global status of schistosomiasis and its control.** Acta Trop. 2000; 77 (1): 41–51

Ciabattini A, Cuppone AM, Pulimeno R, Iannelli F, Pozzi G, Medaglini D. **Stimulation of human monocytes with the gram-positive vaccine vector *Streptococcus gordonii*.** Clin Vaccine Immunol. 2006; 13 (9): 1037-43.

Clingan JM, Yanagawa Y, Iwabuchi K, Onoé K. **Effect of T helper 1 (Th1) / Th2 cytokine on chemokine-induced dendritic cell functions.** Cell Immunol. 2006; 242: 72–79.

Costa-Carvalho BT & Sole D. Bases Imunológicas. In: Farhat CK, Carvalho ES, Weckx LY, Carvalho LHFR, Succi RCM, org. **Imunizações: fundamentos e prática** 4^a ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2000. p. 19–36.

da Cruz FW, McBride AJA, Conceição FR, Dale JW, McFadden J, Dellagostin OA. **Expression of the B-cell and T-cell epitopes of the rabies virus nucleoprotein in *Mycobacterium bovis* BCG and induction of an humoral response in mice.** *Vaccine*. 2002; 20: 731–736

Dai W, Gao H, Huang H, Yuan Y, Hu J, Huangfu Y. **Comparative study on the immunogenicity between recombinant MS-Sj26GST vaccine and recombinant BCG-Sj26GST vaccine in *Schistosoma japonicum*.** *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2003, 23 (3): 213–5

Dellepiane N, Griffiths E & Milstien JB. **New challenges in assuring vaccine quality.** *Bull World Health Organ*. 2000; 78 (2): 155–62

Di Marzo P, Puddu P, Conti L, Belardelli F, Gesani S. **Interferon- γ up-regulates its own gene expression in mouse peritoneal macrophages.** *J Exp Med*. 1994; 179: 1731-1736.

Diaz-Silvestre H, Espinosa-Cueto P, Sanchez-Gonzalez A, Esparza-Ceron MA, Pereira-Suarez AL, Bernal-Fernandez G, Espitia C, Mancilla R. **The 19-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a major adhesin that binds the mannose receptor of THP-1 monocytic cells and promotes phagocytosis of mycobacteria.** *Microb Pathog*. 2005; 39 (3): 97–107

Doyle A & Griffiths JB. **Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology.** West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 1998. Cap.1 The cell: Selection and standardization. p. 3–52

Ellis RW. Technologies for making new vaccines. **In:** Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines**. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2004. p. 1177–1198

Esser MT, Marchese RD, Kierstead LS, Tussey LG, Wang F, Chirmule N, Washabaugh MW. **Memory T cells and vaccines.** *Vaccine*. 2003, 21 (5-6): 419–430

Fantuzzi L, Puddu P, Varano B, Del Corno M, Belardelli F, Gessani S. **IFN-alpha and IL-18 exert opposite regulatory effects on the IL-12 receptor expression and IL-12-induced IFN-gamma production in mouse macrophages: novel pathways in the regulation of the inflammatory response of macrophages.** *J Leukoc Biol*. 2000; 68: 707-714.

FDA – *Food and drug administration*.. **Guidance for industry: Characterization and qualification of cell substrates and other biological starting materials used in the production of viral vaccines for the prevention and treatment of infectious disease.** [online]. Rockville: 2006. [capturado em 10 de janeiro de 2007]. Disponível em: <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>.

Fernandes ATG. **Identificação de células citotóxicas presentes no processo inflamatório uterino durante a co-infecção pelo vírus da imunodeficiência humana HIV e pelo vírus do papiloma humano HPV.** Rio de Janeiro. 2003. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] Fiocruz.

Freshney RI. Introduction to basic principles. In: Masters JRW, org. **Animal cell culture: a practical approach**. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press. 2000a. p. 1–18

_____. **Culture of animal cells: a manual of basic techniques**. 4th ed. New York: Wiley-Liss Inc. 2000b. Cap.1: Introduction. p. 1–8

Guermontprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. **Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells**. Annu Rev Immunol. 2002; 20: 621-67.

Haeseleer F. **Structural instability of recombinant plasmids in mycobacteria**. Res Microbiol. 1994; 145: 683–687

Harrison RG. **Observations on the living developing nerve fiber**. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1910, 140: 1905 – 7 *apud* Freshney RI. Introduction to basic principles. In: Masters JRW, org. **Animal cell culture: a practical approach**. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press. 2000b. p. 1-18.

Hasan Z, Ashraf M, Tayyebi A, Hussain R. **M. leprae inhibits apoptosis in THP-1 cells by downregulation of Bad and Bak and upregulation of Mcl-1 gene expression**. BMC Microbiol. 2006; 6: 1-9.

Hayward CMM, O'Gaora P, Young DB, Griffin GE, Thole J, Hirst TR, Castello-Branco LR, Lewis DJM. **Construction and murine immunogenicity of recombinant Bacille Calmette Guérin vaccines expressing the B subunit of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin**. Vaccine. 1999, 17: 1272–1281.

Hendriksen CFM. **Laboratory animals and immunization procedures: challenges and opportunities**. ILIAR J. 2005; 46 (3): 227–229.

Henriques MGMO & Sampaio ALF. Alternativas para animais de laboratório: sistemas *in vitro*. In: Andrade A, Pinto SC & Oliveira RS, org. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002: 337–344

Kallás EG. **Detecção da produção antígeno-específica de IFN γ e IL-4 por linfócitos T de sangue periférico após infecção e vacinação**. São Paulo 1999. Doutorado [Escola Paulista de Medicina] Universidade Federal de São Paulo

Kaufmann SHE & Flynn JL. CD8 T cells in tuberculosis. In: Cole ST, Eisenach D, McMurray DN, Jacobs Jr WR, org. **Tuberculosis and the tubercle bacillus**. Washington: ASM Press. 2005. p. 155–164.

Kaufmann SH & Hess J. **Impact of intracellular location of and antigen display by intracellular bacteria: implications for vaccine development**. Immunol Lett. 1999; 65 (1-2): 81–4

Kidd P. **Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease**. Altern Med Rev. 2003; 8 (3): 223-246.

Kremer L, Dupre L, Riveau G, Capron A, Loch C. **Systemic and mucosal immune responses after intranasal administration of recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin expressing glutathione S-transferase from *Schistosoma haematobium*.** Infect Immun. 1998; 66 (12): 5669-5676.

Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, Graeber TG, Sieling PA, Liu YJ, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. **TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells.** Nat Med. 2005, 11 (6): 653–660

Laemmli UK. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature. 1970, 227: 680-685

Larsen NG. **Drug and Device Development Guide.** Copenhagen: Medicon Valley Academy. 2005. Cap. 1: Development – definition, costs and time. p. 9-13

Lebens M, Su J, Czerkinsky C, Holmgren J. **Current status and future prospects for a vaccine against schistosomiasis.** Expert Rev Vaccines. 2004; 3 (3): 315-328.

Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, Sherman DR. **Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation.** J Infect Dis. 2003; 187 (1): 117–123

MacCullough KC & Summerfield A. **Basic concepts of immune response and defense development.** ILAR J. 2005; 46 (3): 230–240.

Mantovani A, Sica A & Locati M. **Macrophage polarization comes of age.** Immunity. 2005; 23 (4): 344 – 346

MacFarland J. **Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines.** J Am Med Assoc. 1907; 14: 1176-1178

Medeiros MA. **Desenvolvimento do *Mycobacterium bovis* BCG como sistema de expressão de antígeno vacinal de *Bordetella pertussis*.** Pelotas; 2001. Doutorado – Universidade Federal de Pelotas.

Medeiros MA, Armoa GR, Dellagostin AO, McIntosh D. **Induction of humoral immunity in response to immunization with recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the S1 subunit of *Bordetella pertussis* toxin.** Can. J. Microbiol. 2005; 51 (12): 1015 - 20.

Metz B, Hendriksen CFM, Jiskoot W, Kersten GFA. **Reduction of animal use in vaccine quality control: opportunities and problems.** Vaccine. 2002, 20: 2411 – 2430

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Annette MH. **M1/M2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm.** J Immunol. 2000; 164: 6166-6173.

Misumi S, Endo M, Mukai R, Tachibana K, Umeda M, Honda T, Takamune N, Shoji S. **A novel cyclic peptide immunization strategy for preventing HIV-1/AIDS infection and progression.** J Biol Chem. 2003; 278 (34): 32335-43.

- Mosmann TR. **Cytokines: is there biological meaning?** Curr. Opin Immunol. 1991, 3: 311-314
- Mosmann TR & Coffman RL. **Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells.** Adv. Immunol. 1989, 46: 111-147
- Murray A, Winter N, Lagranderie M, Hill DF, Rauzier J, Timm J, Leclerc C, Moriaty KM, Gheorghiu M, Gicquel B. **Expression of *Escherichia coli* beta-galactosidase in *Mycobacterium bovis* BCG using an expression system isolated from *Mycobacterium paratuberculosis* which induced humoral and cellular immune responses.** Mol Microbiol. 1992, 6 (22): 3331-3342.
- NIAID - *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*. **Understand vaccines: What they are / How they work.** Washington: NIH publication, 2003. 55 pp.
- Ohara N & Yamada T. **Recombinant BCG vaccines.** Vaccine. 2001, 19: 4089–4098
- Oliveira MM, Charlab R, Pessolani MC. ***Mycobacterium bovis* BCG but not *Mycobacterium leprae* induces TNF-alpha secretion in human monocytic THP-1 cells.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96 (7): 973-978.
- Parlow TG. A resposta imunológica. In: Parlow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB, org. **Imunologia médica.** 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004. p. 52-60.
- Pearce EJ & McDonald AS. **The immunobiology of schistosomiasis.** Nat Rev Immunol. 2002; 2 (7):499-511.
- Plotkin SA. **Six revolutions in vaccinology.** Pediatr Infect Dis J. 2005a, 24 (1): 1–9
- _____. **Vaccines: past, present and future.** Nat Med. 2005b, 11 (4 Suppl): S5-S11.
- Plotkin SL & Plotkin SA. A short history of vaccination. In: Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines.** 4th ed. Philadelphia: Saunders, 2004: 1-12
- Presgrave OAF. **Teste de liberação de citocinas como método alternativo ao ensaio de pirogênio em coelhos no controle da qualidade de produtos injetáveis.** Rio de Janeiro; 2003. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] - Fundação Oswaldo Cruz
- Presgrave OAF. Alternativas para animais de laboratório: do animal ao computador. In: Andrade A, Pinto SC & Oliveira RS, org. **Animais de laboratório: criação e experimentação.** Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002. p. 361–368
- Rappuoli R. **From Pasteur to genomics: progress and challenges in infectious diseases.** Nat Med. 2004, 10 (11): 1177–1185
- Reis e Sousa C. **Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity.** Curr Opin Immunol. 2004a, 16 (1): 21–5

_____. **Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls.** *Semin Immunol.* 2004b, 16 (1): 27–34

Rezende CA, De Moraes MT, de Souza Matos DC, McIntoch D, Armoa GR. **Humoral response and genetic stability of recombinant BCG expressing hepatitis B surface antigens.** *J Virol Methods* 2005; 125 (1): 1–9.

Ribeiro de Jesus A, Araújo I, Bacellar O, Magalhães A, Pearce E, Harn D, Strand M, Carvalho EM. **Human immune responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens.** *Infect Immun.* 2000; 68 (5): 2797–803

Ritelli M, Amadori M, Tagliabue S, Pacciarini ML. **Use of a macrophage cell line for rapid detection of *Mycobacterium bovis* in diagnostic samples.** *Vet Microbiol.* 2003; 94: 105-120.

Rosenthal KS & Zimmerman DH. **Vaccines: All things considered.** *Clin Vaccine Immunol.* 2006; 13 (8): 821-829

Russell WMS. & Burch RL. **The Principles of Humane Experimental Technique.** London: Methuen. Smyth, D. 1959. 238 pp.

Saalmüller A. **New understanding of immunological mechanisms.** *Vet Microbiol.* 2006; 117 (1): 32-8.

Sander B. Skansén-Saphir, Damm O, Hakansson L, Andersson J, Andersson U. **Sequential production of Th1 and Th2 cytokines in response to live bacillus Calmette-Guerin.** *Immunology.* 1995, 86 (4): 512–8

Santiago ACC. **Correlação entre a colonização pelos isolados clínicos de *Mycobacterium avium* e a imunidade celular específica a antígenos micobacterianos em pacientes HIV-1 positivos.** Rio de Janeiro 2003. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] FIOCRUZ.

Santos JPS. **Avaliação da estabilidade estrutural e funcional de vetores plasmidiais recombinantes bifuncionais (*Escherichia coli* – *Mycobacterium*) em *Mycobacterium bovis* BCG.** Rio de Janeiro; 2002. Mestrado [Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes] – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Serruto D & Rappuoli R. **Post-genomic vaccine development.** *FEBS Lett.* 2006, 580: 2985–2992.

SLIPE – Sociedade Latinoamericana de Infectologia Pediátrica & API – Associação Panamericana de Infectologia. **Manual de Vacinas da América Latina.** Madrid: Euro RSCG Life Esquema, 2005. 620 pp.

Smith KC & Starke JR. Bacille Calmette-Guérin vaccine. **In:** Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines.** 4ª ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2004 p. 179–210

Smith SG, Patel PM, Selby PJ, Jackson AM. **The response of human dendritic cells to recombinant adenovirus, recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus**

Calmette Guerin and biolistic methods of antigen delivery: different induction of contact-dependant and soluble signals. Immunol Lett. 2001; 76 (2): 79-88.

Standiford TJ. **Anti-inflammatory cytokines and cytokine antagonists.** Curr Pharm Des. 2000, 6 (6): 633-49.

Stokes RW & Doxsee D. **The receptor-mediated uptake, survival, replication, and drug sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* within the Macrophage-like cell line THP-1: A comparison with human monocyte-derived macrophages.** Cell Immunol. 1999; 197: 1-9

Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, Bennett LT, Bansal GP, Young JF, Lee MH, Hatfull GF, Snapper SR, Barletta RG, Jacobs WR, Bloom RR. **New use of BCG for recombinant vaccines.** Nature. 1991, 351: 456-460.

Takahashi H. **Antigen presentation in vaccine development.** Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2003, 26 (5-6): 309–28

Tendler M, Brito CA, Vilar MM, Serra-Freire N, Diogo CM, Almeida MS, Delbem ACB, Silva JF, Savino W, Garrat RC, Katz N, Simpson AJG. **A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine.** Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93: 269–273

Theus SA, Cave MD & Eisenach KD. **Activated THP-1 cells: an attractive model for the assessment of intracellular growth rates of *Mycobacterium tuberculosis* isolates.** Infect Immun. 2004; 72(2): 1169-1173

_____. **Intracellular macrophage growth rates and cytokine profiles of *Mycobacterium tuberculosis* strains with different transmission dynamics.** Infect Dis. 2005; 191 (3): 453–60

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. **Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1).** Int. J. Cancer. 1980; 26: 171-176

Varaldo PB, Leite LCC, Dias WO, Miyaji EN, Torres FIG, Gebara VC, Armôa GRG, Campos AS, Matos DCS, Winter N, Gicquel B, Vilar MM, McFadden J, Almeida MS, Tendler M, McIntosh D. **Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* protects mice from cercarial challenge.** Infect Immun. 2004; 72(6): 3336-3343

Varaldo PB, Miyaji EN, Vilar MM, Campos AS, Dias WO, Armôa GRG, Tendler M, Leite LCC, McIntosh D. **Mycobacterial codon optimization of the gene encoding the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* in recombinant *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin enhances protein expression but not protection against cercarial challenge in mice.** FEMS Immunol Med Microbiol. 2006, 48 (1): 132-139.

Wack A & Rappuoli R. **Vaccinology at the beginning of the 21st century.** Curr Opin Immunol. 2005, 17 (4): 411– 418

WHO. *World health organization*. **TDR Progress: New and Improved Tools - New candidates in development: vaccine development schistosomiasis**. Geneva: 2000. [capturado em 16 de outubro de 2004]. Disponível em: <http://who.int/tdr/research/progress9900/tools/vaccine-schistossomiasis.htm>.

_____. **Global Plan to stop tuberculosis 2006-2015**. Geneva: WHO Press. 2006: 1-17

Wynn TA & Hoffmann KF. **Defining a schistosomiasis vaccination strategy – it is really Th1 versus Th2?** *Parasitol Today*. 2000; 16, (11): 497–501.

Xia HH, Lam SK, Chan AO, Lin MC, Kung HF, Ogura K, Berg DE, Wong BC. **Macrophage migration inhibitory factor stimulated by *Helicobacter pylori* increases proliferation of gastric epithelial cells**. *World J Gastroenterol*. 2005, 11 (13): 1946–1950

Xing Z, Zganiacz A & Santosuosso M. **Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF-alpha and nitric oxide from macrophages via IFN-gamma induction**. *J Leukoc Biol*. 2000; 68: 897-902.

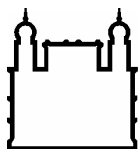
Zhao G, Etherton TD, Martin KR, Vanden Heuvel JP, Gillies PJ, West SG, Kris-Etherton PM. **Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells**. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 336 (3): 909–917.

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE AVALIAÇÃO DE
PROTÓTIPOS VACINAIS EM LINHAGEM DE MONÓCITO HUMANA
(THP-1)**

DANILO PARMERA

RIO DE JANEIRO
2007



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

DANILO PARMERA

**Desenvolvimento de um modelo de avaliação de protótipos
vacinais em linhagem de monócito humana (THP-1)**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos

RIO DE JANEIRO

2007

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas / ICICT / FIOCRUZ - RJ

P253 Parmera, Danilo

Desenvolvimento de um modelo de avaliação de protótipos vacinais em
linhagem de monócito humana (THP-1) / Danilo Parmera. – Rio de Janeiro,
2007.

xiii, 64 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos,
Tecnologia em Imunobiológicos, 2007.

Bibliografia: f. 56-64.

1. THP-1. 2. Vacina BCG. 3. Sm-14. 4. Vacina – Protótipo. 5. Citocinas.
I. Título.

CDD: 615.372

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico, Laboratório de Tecnologia Recombinate e no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Departamento de Micro-Imuno e Parasitologia, Serviço de Imunologia, Laboratório de Imunologia Celular, sob a orientação do Prof. Dr. Geraldo Rodrigues Garcia Armoa e Prof Dra. Maria da Glória Bonecini de Almeida.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

DANILO PARMERA

**Desenvolvimento de um modelo de avaliação de protótipos
vacinais em linhagem de monócito humana (THP-1)**

ORIENTADORES: Prof. Dr. Geraldo Rodrigues Garcia Armôa
Profª. Drª. Maria da Glória Bonecini de Almeida

Examinadores:

Prof. Dr. Douglas McIntosh – Bio-Manguinhos – Presidente

Profª. Drª. Cynthia Silveira Horn – IPEC/FIOCRUZ

Prof. Dr. Walter Martin Roland Oelemann – IMPPG/UFRJ

Rio de Janeiro

Dedico esta Dissertação a Deus,

pele dom da vida.

a minha família

pele carinho e apoio na minha trajetória,

à minha noiva, Fernanda,

pele amor.

AGRADECIMENTOS

À FIOCRUZ, em nome de seu presidente Dr. Paulo Marchiori Buss, por proporcionar a excelência na produção de fármacos e imunobiológicos e no desenvolvimento científico de nosso país.

À Bio-Manguinhos, em nome do seu diretor Dr. Akira Homma, pela oportunidade e condições propiciadas à realização de uma pós-graduação profissional.

Ao IPEC, em nome da sua diretora Dra. Valdiléa Gonçalves Veloso, pelas condições propiciadas à realização da minha dissertação.

Ao orientador e amigo Prof. Dr. Geraldo Rodrigues Garcia Armôa por acreditar no meu potencial, pelos valorosos ensinamentos, apoio incondicional e incentivo aos trabalhos realizados.

À orientadora e amiga Prof^a. Dr^a. Maria da Glória Bonecini de Almeida pelas portas abertas de seu laboratório, possibilitando a execução deste trabalho e pela sincera atenção com que sempre me recebeu e pelo exemplo de pesquisadora.

Aos Professores, Coordenadora e Secretária do MPTI, que muito contribuíram na minha valorização humana e aos meios acadêmicos para ingresso, manutenção e término do curso.

À Dr^a. Cynthia Silveira Horn, pelas importantes contribuições durante a realização deste trabalho, em especial o experimento de proliferação celular.

Ao Dr. Douglas MacIntosh, pelas importantes contribuições durante a realização deste trabalho, em especial no auxílio na realização dos ensaios de *western blotting*, no cultivo das amostras de BCG e na revisão deste manuscrito.

Aos amigos Ana Paula Argondizzo, João Pedro Souza Santos, Gabriela dos Santos Esteves, Dilzamar Velloso do Nascimento, Dr. José Procópio Senna, Dr. Marco Antônio Medeiros, Natália Plínio dos Santos, Dra. Elezer Monte Blanco Lemes, Camilla Bayma, Dra. Ana Carolina Góes pelo companheirismo, amizade, solidariedade e apoio pessoal e profissional.

À amiga Maria Luiza Azevedo pela amizade, eficiência, disponibilidade de auxílio em todos os momentos e palavras reconfortantes nos momentos de desespero.

À doutoranda e amiga Ana Teresa Fernandes pela alegria e disposição no auxílio dos experimentos de imunocitoquímica

Aos tecnologistas e amigos Andréia Lamoglia e Márcio Mantuano pelo auxílio na realização dos experimentos realizados no citômetro de fluxo.

À amiga Larissa Catharina Costa pela colaboração e dedicação nos experimentos infinitos e pelos momentos divertidos no laboratório.

Ao amigo Dyego Carletti pelo auxílio no experimento de proliferação celular.

Aos colaboradores e amigos do Serviço de Imunologia, Dra. Liane Castro, Carla Bial, Márcia Andrade, Millena Rosalba, Ana Cristina Santiago Leandro, Marcelo Leandro, Leonardo Gatto, Silvia Silva, Regina Pimenta, Maristela Lima, Monique Lima e a equipe do laboratório de Imunodiagnóstico pelo companheirismo e apoio.

Aos companheiros do Mestrado Profissional, no qual dividimos boa parte de nossas manhãs, pela cooperação e companheirismo.

Aos parentes e amigos pelos momentos de descontração, conversas, apoio, amizade, alegrias e tristezas compartilhadas. (por serem muitos não serão citados, mas estarão sempre em minha memória)

A todas as pessoas que não foram nominalmente mencionadas, mas que contribuíram para viabilizar este trabalho.

E, finalmente, a Deus, que proporcionou a mim e a minha família os meios possíveis para alcançar a felicidade.

"ESPERE O MELHOR, PREPARE-SE PARA O PIOR E ACEITE O QUE VIER."

Provérbio Chinês

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	lx
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3. METODOLOGIA.....	15
3.1 Cultivo da célula THP-1.....	15
3.2. Cultivo das cepas de BCG.....	16
3.3 Avaliação da expressão da proteína recombinante Sm14 em BCG/ <i>sm14</i>	17
3.4 Padronização da multiplicidade de infecção (MOI) do BCG-P.....	18
3.5 Infecção com BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles em células THP-1.....	19
3.6 Avaliação da capacidade de proliferação celular da célula THP-1.....	19
3.7 Avaliação da estabilidade funcional (expressão do gene <i>kanR</i>) do vetor de expressão pAU5 dos BCGr.....	20
3.8 Protocolo de imunocitoquímica para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1.....	20
3.9 Protocolo de citometria de fluxo para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1.....	22
4. RESULTADOS.....	24
4.1 Cultivo da célula THP-1.....	24
4.1.1 Meios de cultivo.....	24
4.1.2 Manutenção.....	24
4.2. Cultivo das cepas de BCG.....	25
4.3 Expressão da proteína Sm14 pelo BCG/ <i>sm14</i>	26
4.4 Multiplicidade de infecção (MOI) BCG:THP-1	26

4.5 Capacidade de proliferação da célula THP-1 infectada pelo BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles.....	29
4.6 Avaliação da viabilidade e estabilidade funcional (expressão do gene <i>kanR</i>) do BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles recuperados de células THP-1	30
4.7. Avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles em células THP-1 por imunocitoquímica	31
4.8 Avaliação das citocinas a partir da infecção com BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles em células THP-1 por Citometria de Fluxo	34
4.9 Comparação entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo.....	39
4.9.1 Detecção de IL-10.....	39
4.9.2 Detecção de IL-12.....	41
4.9.3 Detecção de TNF- α	43
5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÕES	54
7. PERSPECTIVAS	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	grau Celsius
μCi	micro Curie
μL	Microlitro
μg	Micrograma
ADC	Albumina – Dextrose – Catalase
APC	<i>Antigen presenting cells</i> – célula apresentadora de antígenos
API	Associação Panamericana de Infectologia
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATLA	<i>Alternatives to Laboratory Animals</i>
BCG	<i>Mycobacterium bovis</i> Bacilo Calmette-Guérin
BCG-P	<i>M. bovis</i> Bacilo Calmette-Guérin sub-cepa Pasteur 1173P2
BCGr	<i>M. bovis</i> Bacilo Calmette-Guérin recombinante
BCG/pAU5	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepa Pasteur transformado o vetor de expressão pAU5
BCGr/pPL73-sm14	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepa Pasteur 1173P2 transformado com vetor de expressão pPL73 contendo o gene <i>sm14</i> de <i>S. mansoni</i>
BCG/sm14	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepa Pasteur 1173P2 transformado com o vetor de expressão pAU5 contendo o gene <i>sm14</i> de <i>S. mansoni</i>
Bio-Manguinhos	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
BP	<i>Band pass</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i> – grupo de diferenciação 4
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i> – grupo de diferenciação 8
cm ²	Centímetro quadrado
CMI	<i>Cell-mediated immunity</i> – Imunidade mediada por células
Com	Contagem por minuto
CO ₂	Gás carbônico
CpG	Dinucleotídeo formado pela ligação fosfodiéster de citosina com guanina na mesma fita de DNA
CTFA	<i>Cosmetic, Toiletries and Frangrance Association</i>

DAB	3-3' diaminobenzidina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> – Meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> – Ácido desoxirribonucleico
Dr(a).	Doutor(a)
DTT	Ditioneitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECVAM	<i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i>
EUA	Estados Unidos da América
FABP	<i>Fatty acid binding protein</i> - Proteína ligante a ácidos graxos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> – Isotiocianato de fluoresceína
FL	Análise de fluorescência (citometria de fluxo)
FRAME	<i>Fund for Replacement of Animal Medical Experiments</i>
FSC	<i>Foward angle light scatter</i>
g	Grama
<i>g</i>	Aceleração gravitacional
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i> – Solução salina de Hank
HEPES	Acido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IFN	Interferon
IMPPG	Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
IRAG	<i>Interagency Regulatory Alternatives Group</i>
Kan	Canamicina
<i>KanR</i>	Gene de resistência à canamicina derivado do Tn903
kDa	Kilodaltons
LATER	Laboratório de Tecnologia Recombinante
log	Logaritmo
log ₁₀	Logaritmo na base 10
LPS	Lipopolissacarídeo

LSAB	<i>Labeled StreptAvidin Biotin</i>
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
M1	Macrófago tipo 1
M2	Macrófago tipo 2
MDM	<i>Monocyte-derived macrophage</i> – Macrófago derivado de monócito
MEM	<i>Minimum essential medium of Eagle</i> – Meio mínimo essencial de Eagle
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> - Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitro
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> – Multiplicidade de infecção
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Msc	Mestre
nº	Número
ng	Nanograma
NIAID	<i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i> - EUA
NK	<i>Natural killer cells</i> – Células matadoras naturais
nm	Nanômetro
O ₂	Gás oxigênio
OADC	Ácido oléico – Albumina – Dextrose – Catalase
<i>oriE</i>	Origem de replicação do bacteriófago T4 de <i>Escherichia coli</i>
<i>oriM</i>	Origem de replicação do plasmídeo pAL5000 de <i>Mycobacterium fortuitum</i>
PA	<i>pro analysis</i> - para análise
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> – Padrões moleculares associados ao patógeno
PAPES	Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde
pAU5	Vetor de expressão citoplasmático
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> - Células mononucleares do sangue periférico
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> - Salina tamponada de fosfato

PBS-T	<i>Phosphate-buffered saline Tween20</i> - Salina tamponada de fosfato com Tween20
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
PE	<i>Phycoerythrin</i> - Ficoeritrina
pH	Potencial hidrogenionico
<i>Phsp60*</i>	Promotor <i>hsp60</i> de <i>Mycobacterium bovis</i> BCG modificado
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
POPOP	p-bis[2(5-. feniloxazoil)]-benzeno
PPO	2,5-difeniloxazol
Prof(a)	Professor (a)
PRR	<i>Pattern-recognition receptors</i> – Receptores de reconhecimento padrão
R1	Região de análise (citometria de fluxo)
Reg	Registro
rpm	Rotação por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> – Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SFB	Soro fetal bovino
SLIPE	Sociedade Latinoamericana de Infectologia Pediátrica
Sm14	Proteína de <i>Schistosoma mansoni</i>
Sm14r	Proteína recombinante de <i>S. mansoni</i> expressa em <i>E. coli</i>
<i>sm14</i>	Gene de <i>S. mansoni</i>
SSC	<i>Side angle light scatter</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> – Salina tamponada de Tris
TBS-T	<i>Tris-buffered saline Tween 20</i> – Salina tamponada de Tris com Tween 20
Tc	<i>T cytotoxic cell</i> – Célula T citotóxica
TCR	<i>T cell receptor</i> – receptor de célula T
TDR	<i>Special programme for research and training in tropical disease</i>

TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i> - Fator transformador de crescimento beta
Th	<i>T helper cell</i>
Th1	<i>T helper cell type 1</i> – Célula T auxiliar tipo 1
Th2	<i>T helper cell type 2</i> – Célula T auxiliar tipo 2
Timidina-H ³	Timidina tritiada
TLR	<i>Toll like receptor</i> – Receptor do tipo Toll
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alfa</i> - Fator de necrose tumoral alfa
TPA	12-O-tetradecanolforbol-13-acetato
Treg	<i>T regulatory cell</i> – Célula T regulatória
UFC	Unidades formadoras de colônias por mililitro
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
v	Volume
WHO	<i>World Health Organization</i> – Organização Mundial da Saúde
x	Vezes

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Características das cepas de BCGs	16
Tabela 3.2: Anticorpos utilizados no protocolo de imunocitoquímica.....	21
Tabela 3.3: Anticorpos utilizados no protocolo de citometria de fluxo.....	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Visão esquemática da indução do sistema imune gerada por um patógeno ou uma vacina.....	08
Figura 1.2: Diagrama do modelo molecular da proteína Sm14.....	11
Figura 4.1: Microscopia óptica (200 x) de células THP-1, após três passagens, mantidas em meio RPMI 1640 preparado com 0,2% de NaHCO ₃ e suplementado com 10% de SFB.....	24
Figura 4.2: Cultura de <i>M. bovis</i> BCG Pasteur cultivado em meio 7H11 suplementado com 10% de OADC.....	25
Figura 4.3: Expressão da proteína Sm14 produzida pelos quatro clones de BCG/ <i>sm14</i> utilizados nos experimentos de infecção.....	26
Figura 4.4: Expressão de IL-10, IL-12 e TNF- α em células THP-1 infectadas com BCG-P.....	28
Figura 4.5: Atividade proliferativa das células THP-1 infectadas pelo BCG/ <i>sm14</i> e pelos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5)	29
Figura 4.6: Cinética da viabilidade do protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e dos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5) recuperados de células THP-1 e cultivados nos meios Middlebrook 7H11 7H11/Kan.....	31
Figura 4.7: Microscopia óptica (1000 x) de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após 24 horas de infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), detectadas por imunocitoquímica.....	32
Figura 4.8: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica.....	33
Figura 4.9: Determinação da região de análise das células THP-1 mantidas em cultivo celular.....	34

Figura 4.10: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 TNF- α e após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	35
Figura 4.11: Gráfico tamanho (FSC) <i>versus</i> fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	36
Figura 4.12: Gráfico tamanho (FSC) <i>versus</i> fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	37
Figura 4.13: Gráfico tamanho (FSC) <i>versus</i> fluorescência (FL1 ou FL2) da avaliação de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	38
Figura 4.14: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria de fluxo.....	40
Figura 4.15: Percentagem de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria.....	42
Figura 4.16: Percentagem de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria.....	44
Figura 5.1: Modelo esquemático das etapas necessárias para implantação de novos fármacos e imunobiológicos.....	47

RESUMO

As culturas de células vêm sendo utilizadas extensivamente no desenvolvimento e na produção de uma variedade de produtos terapêuticos e profiláticos, tornando-se uma ferramenta indispensável para geneticistas, imunologistas, vacinologistas e a indústria farmacêutica. A adoção de sistemas de ensaios celulares *in vitro* tem sido aplicada como um método alternativo para a substituição ou diminuição do uso de animais nas fases de desenvolvimento, produção e testes de vacinas, demonstrando resultados promissores. Da mesma forma, sistemas computacionais podem ampliar a utilização desta ferramenta para etapas do desenvolvimento de vacinas candidatas na fase pré-clínica. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um protocolo *in vitro* utilizando culturas de células humanas - a linhagem de monócitos THP-1, para a seleção de um protótipo vacinal - a cepa Pasteur de *Mycobacterium bovis* BCG expressando o antígeno Sm14 de *Schistosoma mansoni* (BCG/sm14). Para isso foram empregadas duas metodologias – citometria de fluxo e imunocitoquímica, para a identificação do perfil da expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α . Foram utilizados como controles a cepa Pasteur do *M. bovis* BCG e a construção da cepa Pasteur do *M. bovis* BCG contendo o vetor de expressão pAU5 (BCG/pAU5). Após padronização, a multiplicidade de infecção utilizada para os experimentos foi de 10 bacilos para 1 célula THP-1 (10MOI). A expressão da proteína Sm14 foi detectada em todos os protótipos vacinais. Para assegurar que o protótipo BCG/sm14 era capaz de diferenciar a linhagem de monócitos THP-1 em macrófagos, avaliamos a taxa de crescimento celular e foi possível observar que após a infecção estas células apresentavam o índice de proliferação diminuído em 2 logs em relação à célula não infectada. O protótipo vacinal BCG/sm14 não mostrou diferenças quanto a capacidade de infecção, a taxa de persistência intracelular e a estabilidade da construção plasmidial. As duas metodologias empregadas mostraram resultados discrepantes em relação ao percentual de citocinas expressas após a infecção com o protótipo vacinal ou os BCG controles, mostrando um maior percentual de células positivas quando avaliados por citometria de fluxo. Contudo, mesmo com esta diferença observamos que o protótipo vacinal BCG/sm14 não alterou o perfil de expressão de IL-10, IL-12 e TNF- α . O fato do plasmídeo pAU5 ser um vetor de expressão citoplasmática, sugere que a proteína Sm14 não foi capaz de estimular a mudança de citocinas em monócitos humanos. Experimentos futuros devem investigar o papel do BCG/sm14 em macrófagos maduros, quanto a indução de citocinas pró e anti-inflamatórias, TLR, bem como na indução da resposta imune adaptativa, como a apresentação antigênica, na tentativa de melhor entender a resposta imune a esta vacina candidata.

ABSTRACT

Cell cultures has been used extensively in the development of a broad range of therapeutic and prophylactic products, and are an important tool for geneticists, immunologists, vaccinologists and the pharmaceuticals industry. *In vitro* cell assay has been applied as an alternative method to replace or diminish the use of animal model in the developmental, production in vaccine test phases, with promising results. Otherwise, computational methods should amplify the use of cell cultures tools to test candidate vaccines. The mean goal of this work was to develop an *in vitro* protocol using human cell line – monocytic cell THP-1, to select a vaccine prototype – strain Pasteur *Mycobacterium bovis* BCG expressing *Schistosoma mansoni* Sm14-antigen (BCG/sm14). Two methodologies were employed – a flow cytometry and immunocytochemistry, to quantify the expression of IL-10, IL-12 e TNF- α . Pasteur *M. bovis* BCG and the strain Pasteur do *M. bovis* BCG containing the expression vector pAU5 (BCG/pAU5) were used as controls. Multiplicity of infection (MOI) was determined and showed a better 10 bacilli to 1 cells ratios, regarding the expression of intracellular cytokines. Sm14 protein expression was detected in all vaccine prototype before use. To assure that BCG/sm14 was able to differentiate monocytic THP1 cell line in mature macrophage, we evaluated the proliferative ration after BCGs infection and all strain showed the ability to induce monocytic THP1 cells maturation, diminishing in 2.0 logs the cell proliferation. No differences were seen in the uptake, intracellular persistence and plasmidial stability. Interestingly, we observe discrepant results regarding the amount of positive cells expressing cytokines detected by the two methods used, independent of which BCG was tested. The overall results obtained by the cytometric method was high than immunocytochemistry. However, beside these ambiguous results, no alteration in the IL-10, IL-12 and TNF-alfa profile was observed when BCG/sm14 was compared with BCG. These results point to the plamidial BCG construction pAU5 and its intracellular expression, suggesting no modification in the cytokine profile in human monocytic cell lines. Further experiments should be addressed to identify the role of BCG/sm14 in modulate mature macrophage and, the induction of adaptive immune response, as antigen presentation, pro- and anti-inflammatory cytokines, TLR expression and activation, to better understating the vaccine prototype immune response .

1. INTRODUÇÃO

A vacinologia é uma ciência combinatória que estuda a diversidade de agentes patogênicos, o sistema imune humano e preparações vacinais que possam modular a resposta imune para prevenir ou curar as doenças causadas por esses patógenos (Brusic, August & Petrovsky 2005). Sendo a vacina um imunógeno não-patogênico que ao ser inoculado em um indivíduo é capaz de induzir imunidade protetora contra um patógeno específico (Parslow 2004), a vacinação, bem como a limitação à exposição de pessoas saudáveis às infectadas e eliminação da fonte ou meios de disseminação do agente infeccioso, contribui para a prevenção de doenças. As propriedades necessárias para uma vacina ideal são: promover imunidade ao longo da vida, ser largamente protetora contra todas as variantes do patógeno, prevenir a transmissão de doença, induzir a imunidade rapidamente, ser eficaz em todas as pessoas vacinadas, transmitir a proteção materna ao feto, possuir baixo custo, ser estável, ser segura e necessitar de poucas ou, de maneira ideal, uma só administração que induza proteção. (Ada 2001, Beverley 2002, NIAID 2003).

O desenvolvimento das vacinas ao longo da história pode ser destacado de acordo com as revoluções tecnológicas aplicadas na vacinologia (Plotkin 2005a). No final do século XVIII o médico inglês Edward Jenner realizou a experiência que foi considerada o marco da imunologia como ciência. Jenner inoculou, a partir de arranhões feitos no braço de um menino de oito anos (James Phipps), o líquido extraído da vesícula causada pela varíola bovina da mão da ordenhadeira Sarah Nelmer (André 2003, Plotkin & Plotkin 2004). Contudo, somente quase um século após a descoberta de Jenner, Louis Pasteur desenvolveu o conceito que levaria à primeira revolução da vacinologia: a atenuação da virulência de patógenos, criando a primeira vacina em laboratório e instituindo o conceito de vacinação. Pasteur estabeleceu as bases do que ficou conhecida como abordagem clássica para o desenvolvimento de vacinas, que incluem o isolamento do patógeno, a perda da virulência (atenuação) e a imunização com partes do microrganismo ou o microrganismo inteiro (Plotkin & Plotkin 2004, Plotkin 2005b, Serruto & Rappuoli 2006).

No final do século XVIII, Salmon e Smith descreveram o conceito que levaria a segunda revolução tecnológica da vacinologia, a inativação do patógeno para o desenvolvimento de preparações vacinais. A expansão deste conceito levou a

construção de vacinas feitas a partir de toxinas detoxificadas (toxóides) e frações subcelulares como polissacarídeos, proteínas e conjugados (Plotkin & Plotkin 2004, Plotkin 2005a, Plotkin 2005b). A adaptação de cultura de células para o cultivo de vírus visando a obtenção de preparações vacinais foi considerada a terceira grande revolução tecnológica utilizada pela vacinologia (Plotkin & Plotkin 2004, Plotkin 2005a, Plotkin 2005b). A introdução de novas estratégias para o desenvolvimento de vacinas a partir da utilização de técnicas de biologia molecular como: clonagem de genes e expressão de proteínas recombinantes, criação de partículas defectivas, desenvolvimento de vetores vivos atenuados, sequenciamento de genomas, genômica comparativa, proteômica e vacinologia reversa; abriram novas fronteiras na vacinologia para a busca de preparações imunogênicas que sejam efetivas no combate às doenças infecciosas. Essa nova onda de desenvolvimento está sendo considerada como a quarta revolução tecnológica da vacinologia (Ellis 2004, Plotkin 2005a, Plotkin 2005b, Serruto & Rappuoli 2006).

A compreensão e a importância da resposta imune após a vacinação sofreram um avanço notável nos últimos anos (Saalmüller 2006), marcando assim uma nova era para o desenvolvimento de vacinas. Para Plotkin (2005b), o novo foco dos vacinologistas está no desenvolvimento de meios, como vetores, replicons, lipopeptídeos e adjuvantes que dirijam a polarização do sistema imune para uma resposta do tipo 1, ou seja, a estimulação da imunidade celular. Plotkin destaca também o desenvolvimento de novas rotas de imunização tais como intranasal, aerossol, transcutânea, oral e retal (Plotkin 2005b). Já para Rappuoli (2004), a vacinologia atual está focada no processo de obtenção de imunógenos a partir da investigação pan-genômica, análise por microarranjos de DNA (*DNA microarray*) e proteômica, numa abordagem conhecida como vacinologia reversa. Serruto e Rappuoli (2006) enfatizam que o futuro do desenvolvimento de vacinas está na chamada vacinologia estrutural, na qual através da resolução atômica e da estrutura dos antígenos potenciais, será realizado o desenho racional dos epítomos alvos usados como candidatos vacinais. Observa-se então que a integração entre a tecnologia básica, os avanços tecnológicos na biologia molecular e o aumento do entendimento da resposta imune são a base para o desenvolvimento de novos candidatos a preparações vacinais (Rosenthal & Zimmerman 2006).

A imunidade, ou resposta imune, pode ser dividida em dois tipos: a imunidade inata e a imunidade adquirida ou adaptativa. A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa contra agentes patogênicos e consiste no desencadeamento de

mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que já existiam antes do estabelecimento de uma infecção e que atuam da mesma forma em infecções sucessivas. As barreiras anatômicas (pele e epitélio de mucosa), barreiras fisiológicas (temperatura, áreas com baixo pH, mediadores químicos), fagócitos mono e polimorfonucleares e barreiras inflamatórias são parte da imunidade inata (Parslow 2004, Abbas & Lichtman 2005b, McCullough & Summerfield 2005). As células da imunidade inata utilizam receptores de reconhecimento padrão (*pattern-recognition receptors* – PRR) do tipo Toll (*Toll like receptors* - TLRs) para o reconhecimento de estruturas microbianas altamente conservadas que não estão presentes em células de mamíferos, como padrões moleculares associados ao patógeno (*pathogen-associated molecular patterns* – PAMPs). Os TLRs possuem a capacidade de reconhecer diferentes PAMPs, como seqüências CpG de DNA não metiladas, lipídeos e carboidratos complexos como lipopolissacarídeos (LPS) e ácidos teicóicos (Reis e Sousa 2004b, Krutzik *et al.* 2005, Rosenthal & Zimmerman 2006).

A imunidade adaptativa caracteriza-se por sua alta especificidade e por ampliar a magnitude da resposta após sucessivas exposições a um determinante antigênico. Além dos muitos mecanismos da imunidade natural necessários à eliminação dos microorganismos invasores, a imunidade adaptativa utiliza a seleção e a mutação somática na geração de seu repertório imune desenvolvendo duas outras propriedades adicionais: a memória em relação aos contatos anteriores com um determinado antígeno, de modo que as exposições subseqüentes estimulem respostas de defesa gradativamente mais efetivas, e a capacidade de amplificar os mecanismos protetores da imunidade natural, direcionando-os para os locais de entrada do antígeno e melhorando o processo de eliminação dos elementos estranhos ao organismo hospedeiro (Costa-Carvalho & Solé 2000). A imunidade adaptativa é classificada como humoral ou celular em função do componente do sistema imunológico intermediador da resposta imune. A imunidade humoral é mediada por anticorpos, que são capazes de efetuar o reconhecimento específico agindo na neutralização de microorganismos e toxinas, na ativação do sistema do complemento e na opsonização de antígenos para aumento da fagocitose. A imunidade celular ou mediada por células (*cell-mediated immunity* – CMI) refere-se à resposta imune efetora das células T atuando na ativação de fagócitos, estimulação das atividades microbicidas dos macrófagos, células T e células *natural killer* (NK) na destruição de células infectadas. A CMI atua na defesa contra microorganismos

intracelulares, na imunidade antitumoral e na rejeição de aloenxertos (Parslow 2004, McCullough & Summerfield 2005).

As células T podem ser classificadas em dois grandes grupos de acordo com a expressão dos antígenos de superfície: T CD4 e T CD8. As células T CD8 efetoras são funcionalmente conhecidas como células T citotóxicas (T *cytotoxic* – Tc). As células Tc atuam principalmente na lise de células infectadas com patógenos presentes em seu citoplasma, desempenhando sua função através da liberação de dois tipos de citotoxinas: as granzimas, que são capazes de induzir apoptose na célula-alvo e as perforinas, que perfuram a membrana celular da célula-alvo facilitando a ação das granzimas (Esser *et al.* 2003, Kaufmann & Flynn 2005). Já as células T CD4 efetoras são funcionalmente conhecidas como células T auxiliares (T *helper* – Th). As células Th desempenham um papel central na função de vários processos como ativação, inibição, regulação, diferenciação e proliferação de diferentes tipos celulares como as células T CD8, células B, células NK, eosinófilos e macrófagos, tanto por contato célula-célula como pela produção de citocinas (Esser *et al.* 2003, Kidd 2003). As células Th são divididas principalmente em duas sub-populações fenotipicamente distintas, T *helper* tipo 1 (Th1) ou T *helper* tipo 2 (Th2), que proporcionam a estruturação de um modelo útil na compreensão da imunorregulação dependente de célula T (Mosmann & Coffman 1989, Mosmann 1991, McCullough & Summerfield 2005).

O conceito de células Th1/Th2 baseia-se na dicotomia do perfil de citocinas expressas, uma vez que cada sub-população de célula Th amplifica a si mesma e promove a regulação cruzada da sub-população recíproca. As citocinas produzidas por células Th1 são reconhecidamente capazes de suprimir a proliferação celular, a síntese de citocinas e/ou a atividade biológica induzidas por citocinas da resposta Th2, e vice-versa. Nas respostas imunes geradas pelas células Th1 as principais citocinas produzidas são as interleucinas (IL) 2 e o interferon gama (IFN- γ) direcionando o sistema imune para uma resposta mediada por células. A produção de anticorpos não é uma característica proeminente da resposta Th1, mas sua combinação com a resposta celular é necessária no combate de infecções intracelulares e fúngicas e de células cancerosas através de mecanismos diretos (destruição de células infectadas) e indiretos como a ação do interferon na proteção de células não infectadas (Esser *et al.* 2003, Kidd 2003, Rosenthal & Zimmerman 2006). Já as respostas imunes geradas pelas células Th2 são especialmente eficazes contra parasitas extracelulares e toxinas por mecanismos dependentes de

anticorpo e as citocinas dominantes produzidas são IL-4, IL-5, IL-10, e IL-13, direcionando para uma alta produção de anticorpos (Esser *et al.* 2003, Kidd 2003, Clingan *et al.* 2006, Rosenthal & Zimmerman 2006).

As células T não possuem receptores capazes de reconhecer diretamente antígenos. Os receptores de antígenos das células T (*T cell receptors* – TCRs) reconhecem somente fragmentos de antígenos expostos na superfície de outras células associados principalmente a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (*Major histocompatibility complex* - MHC). Há dois tipos principais de moléculas de MHC, denominadas de moléculas de MHC de classe I e moléculas de MHC de classe II e seu padrão de expressão está intimamente ligado às funções das células T. As moléculas MHC de classe I são expressas por todas as células do organismo exceto hemácias, sendo complexadas a antígenos encontrados no citoplasma celular e reconhecidas pelas células Tc. As moléculas MHC de classe II são expressas principalmente por células especializadas conhecidas como células apresentadoras de antígenos (*antigen presenting cells* – APC), que apresentam antígenos oriundos de vesículas endocíticas as células Th (Esser *et al.* 2003).

As APCs são células especializadas na captura de microorganismos e outros antígenos, na apresentação desses antígenos às células T e na expressão de sinais que estimulam a proliferação e diferenciação de linfócitos (Takahashi 2003, Abbas & Lichtman 2005b), possuindo um papel crucial na interação entre as imunidades inata e adaptativa. Seus principais representantes são as células dendríticas, os linfócitos B e os macrófagos (Guermonprez *et al.* 2002, Abbas & Lichtman 2005b). As células dendríticas são conhecidas como APCs profissionais por possuírem como função a captura e a apresentação de antígenos às células T virgens, promovendo juntamente com sinais co-estimulatórios, a expansão clonal e a diferenciação em células T efetoras (Guermonprez *et al.* 2002, Takahashi 2003, Reis e Sousa 2004a). As células B, dentre outras funções, são capazes de apresentar antígenos às células T efetoras sendo essenciais para a produção de anticorpos dependentes de células Th (Parlow 2004).

Os macrófagos são células fagocitárias mononucleadas, derivados dos monócitos sanguíneos e são encontrados nos tecidos desempenhando importantes papéis nas respostas imunes inata e adquirida. Possuem um papel central na resposta inicial à infecção antes da ação da imunidade mediada pelas células T e B, sendo importantes na fase de indução de inflamação, reorganização e reparo dos

tecidos, além de realizarem funções efetoras. São classificados como células apresentadoras de antígenos e têm diversas atividades, como atividade antimicrobiana e antitumoral, modulação de várias células, e promoção de quimiotaxia (Auwerx 1991, Mills *et al.* 2000, Berges *et al.* 2005).

Os macrófagos foram denominados M1 e M2 de acordo com o seu padrão de ativação (Mills *et al.* 2000). Assim, macrófagos M1 provenientes de células Th1 apresentam uma resposta efetora caracterizada pela produção dominante de óxido nítrico (NO) em resposta ao LPS ou IFN- γ exógeno. Macrófagos M2, de linhagens Th2, por sua vez, exibem um perfil tolerante caracterizado pela produção de altos níveis de fator transformador de crescimento beta (*transforming growth factor beta* - TGF- β) (Bastos *et al.* 2002, Mantovani, Sica & Locati 2005). O padrão de ativação assumido por esses macrófagos parece ser independente de linfócitos, uma vez que macrófagos de camundongos apresentam a mesma polarização. Esse fato sugere a importância das citocinas produzidas por essas células na regulação de suas funções. A influência da IL-10, IL-12, IL-18, IFN- α e IFN- γ na regulação autócrina de macrófagos tem sido descrita, demonstrando que os macrófagos não apenas obedecem às ordens dos linfócitos T, como podem até mesmo comandar o tipo de resposta dessas células. Adicionalmente, através das citocinas produzidas por eles, são aptos a se auto-regularem (Di Marzo *et al.* 1994, Fantuzzi *et al.* 2000, Mills *et al.* 2000, Xing, Zganiacz & Santosuosso 2000, Bastos *et al.* 2002, Mantovani, Sica & Locati 2005).

As citocinas constituem um grupo de proteínas de baixo peso molecular, geralmente glicosiladas, secretadas por diferentes células do sistema imune, como linfócitos, monócitos e macrófagos. Suas ações são geralmente pleiotrópicas, podendo atuar de forma autócrina, parácrina e endócrina, na mediação de diferentes efeitos biológicos (Abbas & Lichtman 2005a). Dentre as citocinas utilizadas para a avaliação de protótipos vacinais na ativação de APCs, podemos destacar TNF- α , IL-10 e IL-12 (Henriques & Sampaio 2002, Abbas & Lichtman 2005a). A IL-10 é uma citocina reguladora secretada por macrófagos ativados e por algumas células Th. Tem ação anti-inflamatória, agindo na inibição de macrófagos e células dendríticas ativados, inibindo a ação de IL-12, TNF- α e IFN- γ , com efeitos associados ao término das reações da CMI (Standiford 2000, Atkinson *et al.* 2000, Abbas & Lichtman 2005a). A IL-12 é a principal citocina mediadora da resposta imune inata a patógenos intracelulares, dentre os quais as micobactérias, sendo um importante indutor de CMI. Atua na ativação de células T citotóxicas e células NK induzindo a

produção de INF- γ , o qual ativa os macrófagos infectados e na diferenciação das células Th1, possuindo um importante papel na interação entre a imunidade inata e adaptativa (Atkinson *et al.* 2000, Abbas & Lichtman 2005a). O TNF- α é uma das principais citocinas mediadoras da resposta pró-inflamatória produzida principalmente por fagócitos mononucleares ativados além de células T, células NK e mastócitos. Atua principalmente no recrutamento de neutrófilos e monócitos para os sítios de infecção, na indução de macrófagos e células endoteliais para secreção de quimiocinas e na indução de apoptose em algumas células (Atkinson *et al.* 2000, Standiford 2000, Abbas & Lichtman 2005a).

Os monócitos e macrófagos possuem um papel crucial na apresentação de antígenos estranhos a outras células do sistema imune e na produção de sinais que direcionam o padrão da resposta imune necessária para cada tipo de patógeno. Dentre os sinais podemos destacar as citocinas, que são proteínas imunomoduladoras que ajudam a direcionar a resposta imune em diversos processos inflamatórios incluindo processos infecciosos (Xing, Zganiacz & Santosuosso 2000, Berges *et al.* 2005). Por essas características, os macrófagos vêm sendo utilizados para avaliar o perfil imunogênico de diferentes antígenos candidatos à vacina (Campbell, Mann & Chadee 2000, Misumi *et al.* 2003, Ciabattini *et al.* 2006). Adicionalmente, é importante considerar que entre os principais requerimentos para o sucesso da vacinação está a ativação das APCs, que envolve o processamento de antígenos, a expressão de fatores co-estimulatórios, e a secreção de citocinas, que é essencial para o início da resposta imune (Ada 2004).

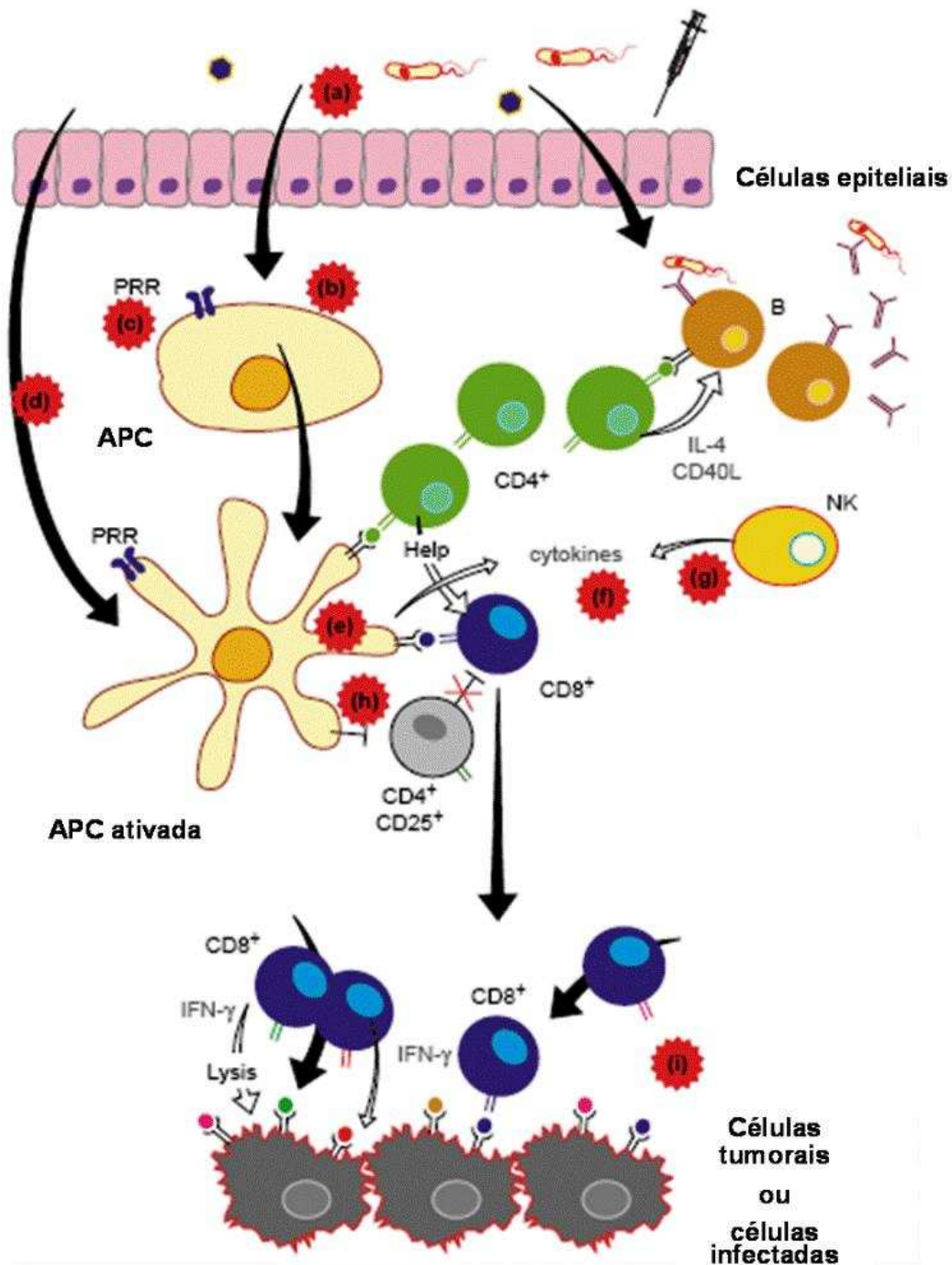


Figura 1.1: Visão esquemática da indução do sistema imune gerada por um patógeno ou uma vacina (Adaptado de Wack & Rappuoli 2005). As letras de (a) a (i) indicam situações onde o melhoramento de vacinas pode levar a respostas imunes mais eficientes. (a) A via de inoculação pode influir no tipo de resposta imune e reduzir o número de doses. (b) O antígeno particulado é reconhecido mais facilmente por APCs em relação ao antígeno solúvel. (c) Aumento da ativação de APCs através do reconhecimento de imunoestimulantes pelas PRRs. (d) A maturação e o carreamento de antígenos *in vitro* pelas APCs são candidatos vacinais promissores. (e) A vacinação de DNA leva a uma maior eficiência na apresentação de antígenos pelas moléculas de MHC de classe I. (f) O uso de citocinas como adjuvante natural de vacinas. (g) O recrutamento de células NK pode ser relacionado à produção inicial de citocinas do tipo Th1. (h) As vacinas podem atuar no efeito regulatório das células Treg CD4 CD25 visando a quebra da tolerância imunológica. (i) A pré-existência de células T específicas para antígenos expressos por células tumorais não contidos na vacina expande-se após a vacinação, predominando na resposta anti-tumor.

O advento da cultura celular no início do século passado surgiu como um método para estudar o comportamento de células dos animais sem as variações sistêmicas que poderiam surgir no animal tanto durante a homeostase, como durante um estado de estresse de um experimento (Harrison 1910, Carrel 1912 *apud* Freshney 2000b). As culturas de células vêm sendo utilizadas extensivamente para o desenvolvimento e a produção de uma variedade de produtos terapêuticos e profiláticos incluindo hormônios, citocinas, enzimas, antibióticos e vacinas tornando-se, por essa razão, uma ferramenta indispensável para geneticistas, imunologistas, vacinologistas e, especialmente, para a indústria farmacêutica (Freshney 2000a, FDA 2006).

Em 1991, Auwerx comparou diferentes linhagens de células mielóides de origem humana (HL-60, U-937, KG-1, HEL e THP-1) e concluiu que as células THP-1, após o tratamento com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), podem servir de modelo para o estudo *in vitro* dos mecanismos de regulação gênica, funções fisiológicas e diferenciação monócito/macrófago, assim como podem ser utilizadas no estudo dos vários aspectos biológicos do macrófago como o seu papel nos mecanismos de defesa e como célula secretora (Stokes & Doxsee 1999, Medeiros, 2001, Oliveira, Charlab & Pessolani, 2001, Ritelli *et al.* 2003, Theus, Cave & Einsenach, 2004, Berges *et al.* 2005, Zhao *et al.* 2005, Amadori *et al.* 2006).

A célula THP-1 é um monócito obtido a partir do sangue de uma criança com leucemia aguda (Tsuchiya *et al.* 1980, ATCC 2006). Na sua caracterização foi descrito que essas células apresentam capacidade fagocítica, expressão de lisozima e teste negativo para o vírus Epstein-Barr (Tsuchiya *et al.* 1980). Além disso, não possuem atividade citolítica dependente de anticorpo e sua diferenciação pode ser induzida por compostos do tipo ésteres de forbol como, por exemplo, 12-O-tetradecanolforbol-13-acetato (TPA) ou PMA (Tsuchiya *et al.* 1980, Stokes & Doxsee 1999, ATCC 2006).

Theus, Cave & Einsenach (2004) destacaram que as vantagens do uso da linhagem celular THP-1 como modelo de diferenciação monócito/macrófago *in vitro* são a invariabilidade da sua função de macrófago e a reprodutibilidade do crescimento celular o que permite seu estudo em diferentes estágios (normal *versus* ativado). Além disso, foi demonstrado que a diferenciação da THP-1 pode ser utilizada como modelo experimental para maturação de células dendríticas humanas

(Berges *et al* 2005) e como modelo para a avaliação da resposta inflamatória a diferentes ácidos graxos poliinsaturados (Zhao *et al.* 2005).

Stokes e Doxsee (1999) demonstraram que as células THP-1 podem ser utilizadas como modelo para investigar as interações micobacterianas em macrófagos e Medeiros (2001) utilizou-as como substrato para a avaliação da estabilidade estrutural e funcional de cepas de *Mycobacterium bovis* bacilo Calmette-Guérin (BCG) recombinante (BCGr) expressando antígeno de *Bordetella pertussis*. Oliveira, Charlab & Pessolani (2001) compararam o nível de expressão de TNF- α em células THP-1 infectadas com BCG e *Mycobacterium leprae* e, posteriormente, o uso das células THP-1 foi proposto para o desenvolvimento de uma alternativa rápida para a detecção de *M. bovis* no diagnóstico de tuberculose bovina (Ritelli *et al.* 2003, Amadori *et al.* 2006), e como modelo para avaliação da virulência e da persistência intracelular de micobactérias modificadas geneticamente (Lewis *et al.* 2003).

O Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) vem trabalhando desde 1995, com o apoio dos programas PAPES (Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde) e PDTIS (Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e de Bio-Manguinhos, na tecnologia para modificação genética da vacina BCG com o objetivo de desenvolvimento de vacinas vetorizadas contra agentes infecciosos e parasitários. Nesse processo vários cepas de BCG recombinante (BCGr) foram construídas visando a expressão de antígenos protetores de diversos patógenos como *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, o vírus da Hepatite B, entre outros (Medeiros 2001, Santos 2002, Rezende *et al.* 2005, Medeiros *et al.* 2005). Como parte desse mesmo projeto Argondizzo desenvolveu, em 2005, diferentes protótipos vacinais de BCGr expressando a proteína Sm14 de *Schistosoma mansoni* (Figura 1.2) como possíveis alternativas vacinais para a imunoprofilaxia da esquistossomose.

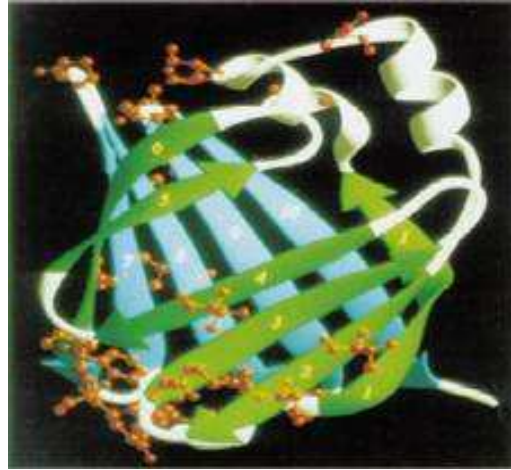


Figura 1.2: Diagrama do modelo molecular da proteína Sm14 (Adaptado de Tendler *et al* 1996)

A esquistossomose é um problema mundial. Estima-se atualmente que pelo menos 200 milhões de pessoas estejam infectados pelo *Schistosoma mansoni* e que mais de 600 milhões de indivíduos estejam em risco no Brasil e no mundo (Argondizzo 2005, Varaldo *et al.* 2006). Dentre as razões para a obtenção de uma vacina efetiva contra o *Schistosoma mansoni* está a elevada frequência da doença na população de muitas regiões, principalmente em países em desenvolvimento, podendo levar os pacientes com a forma hepatoesplênica a um padecimento crônico grave e mortal, sendo assim um grande desafio para a Saúde Pública (WHO 2000). No entanto, a Organização Mundial da Saúde (WHO) através de seu Programa Especial para Treinamento e Pesquisa (TDR), identificou seis antígenos como candidatos para o desenvolvimento de uma vacina. Dentre esses antígenos destaca-se a proteína Sm14, que é uma proteína ligante a ácidos graxos (FABP), de 14 kDa presente no esquistossômulo adulto (Chitsulo *et al.* 2000, WHO 2000, Al-Sherbiny *et al.* 2003).

Na busca de uma vacina candidata contra a esquistossomose, a estratégia de utilização da vacina BCG como vetor para a expressão de antígenos de *S. mansoni* *in vivo* é provavelmente uma das iniciativas mais importantes e de melhor relação custo - benefício no momento para o controle da esquistossomose em países sub-desenvolvidos ou em desenvolvimento (Kremer *et al.* 1998, Dai *et al.* 2003, Varaldo *et al.* 2004, Argondizzo 2005, Varaldo *et al.* 2006). Isso ocorre porque o BCG apresenta um elenco de vantagens de difícil superação entre os vetores vivos atenuados disponíveis no momento, tais como o fato de já ter sido administrado a

bilhões de pessoas no mundo inteiro com baixo índice de efeitos colaterais, poder ser administrado em qualquer época após o nascimento, não ser afetado pelos anticorpos maternos, apresentar baixo custo de produção e ser uma das vacinas mais termoestáveis que se conhece (Smith & Starke 2004, Bonah 2005, SLIPE & API 2005, WHO 2006). Além disso, possui baixo custo de produção, é estável do ponto de vista da atenuação, é controlável por antibióticos, apresenta tropismo por células responsáveis pela montagem da resposta imune (células dendríticas, macrófagos e células linfóides) e é capaz de induzir uma resposta imune celular e humoral contra bactérias, vírus, parasitas e toxinas (Ohara & Yamada 2001, Smith & Starke 2004, SLIPE & API 2005, WHO 2006). Essas características fazem do BCG um dos mais promissores vetores vivos atenuados para uma plataforma vacinal visando a liberação de antígenos heterólogos protetores *in vivo* (Medeiros 2001, Ohara & Yamada 2001, Santos 2002, Smith *et al.* 2001, Argondizzo 2005, Varaldo *et al.* 2004, Varaldo *et al.* 2006).

A capacidade do *M. bovis* BCG sub-cepa Pasteur transformado com plasmídeo pPL73 expressando a proteína Sm14 de *S. mansoni* (BCGr/pPL73-sm14) de induzir efeito protetor semelhante ou maior do que a proteção induzida por três doses da mesma proteína produzida e purificada a partir de *Escherichia coli*, foi avaliada na Fundação Oswaldo Cruz utilizando modelo murino para estudos de proteção, via intraperitoneal, com uma ou duas doses do BCGr/pPL73-sm14, em combinação ou não, com uma dose de reforço da proteína recombinante Sm14 purificada. Nessas condições demonstrou-se que o BCGr/pPL73-sm14 em dose única foi capaz de induzir aproximadamente 50% de proteção. No entanto, apesar dos camundongos vacinados com BCGr/pPL73-sm14 via intraperitoneal não apresentarem anticorpos anti-Sm14, esplenócitos desses animais liberaram IFN- γ quando estimulados com a proteína recombinante Sm14r, sendo assim capaz de induzir níveis de proteção similares àqueles induzidos pela proteína Sm14r, com a vantagem do BCGr/pPL73-sm14 ser administrado em dose única (Varaldo *et al.* 2004).

Apesar da existência na FIOCRUZ de modelo murino de proteção padronizado e aprovado internacionalmente para a avaliação de protótipos vacinais contra a esquistossomose, o grande desafio do projeto para uma nova vacina, com o protótipo BCG/sm14, é a demonstração de proteção em modelo humano. Por essa razão, objetivamos nesse trabalho o desenvolvimento de um protocolo visando o uso de células humanas na avaliação e seleção de vacinas candidatas contra a

esquistossomose. Com essa finalidade, utilizamos como substrato monócitos humanos derivados da linhagem THP-1 para avaliação e quantificação da expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α verificadas após a infecção das células THP-1 com o protótipo vacinal BCG/*sm14*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Demonstrar a viabilidade de um sistema de avaliação *in vitro* para protótipos vacinais baseado no perfil de citocinas expressas pela linhagem celular de monócitos humanos THP-1.

2.2 Objetivos Específicos

- Criar um protocolo de infecção com o *Mycobacterium bovis* BCG em células THP-1
- Avaliar a estabilidade funcional, o grau de infecciosidade e a persistência intracelular do protótipo vacinal BCG/*sm14* em células THP-1
- Avaliar a capacidade do protótipo vacina BCG/*sm14* de induzir a diferenciação e maturação de células THP-1
- Avaliar, quantificar e comparar a expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α após infecção com protótipo vacinal BCG/*sm14* e com os BCGs controles (BCG Pasteur e construção BCG/pAU5) em células THP-1

3. METODOLOGIA

3.1 Cultivo da célula THP-1

A linhagem celular THP-1 (ATCC nº. TIB 202) foi obtida do acervo do Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) de Bio-Manguinhos, Fiocruz mantidos em nitrogênio líquido (-196°C) por no máximo de 12 meses. As células foram descongeladas de criotubos Posteriormente, foram realizadas três lavagens com PBS [137mM de NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 2.7mM KCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 10mM Na₂HPO₄ (Merck) e 1.8mM KH₂PO₄ (Merck)] 1X pH 7.4. Para a manutenção celular foram testados, diversos meios de cultura (MEM, D-MEM e RPMI 1640) e suplementos [soro fetal bovino inativado – SFB (Gibco Life Technology / Invitrogen, Grand Island, EUA), HEPES (Gibco), L-glutamina Sigma-Aldrich), NaHCO₃ (Merck), 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), piruvato de sódio (Sigma-Aldrich), estreptomicina/penicilina (Gibco), gentamicina (Gibco)]. Após observação morfológica das células por microscopia óptica (400 x), definiu-se que para os experimentos propostos seria utilizado o meio de cultura foram cultivadas inicialmente em meio RPMI 1640 (Gibco) formulado com 0,2% (v/v) de NaHCO₃ (Sigma-Aldrich), suplementado com 20% (v/v) de SFB e mantidas em garrafas T de 25 cm² (Corning, Corning, EUA) a 37°C em atmosfera com 5% de gás carbônico (CO₂) por 3 dias.

Quando da necessidade de se ampliar o acervo desta linhagem, as células foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos, lavadas duas vezes em PBS e ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB. A concentração e viabilidade celular foram determinadas em hemocítmetro por microscopia óptica (100 x) utilizando-se a diluição de 1:50 em azul de tripan 0,4% (Gibco). Para a criação dos lotes de trabalho, após as etapas de centrifugação e lavagem, as células foram ressuspensas na concentração de 1 x 10⁷ células/mL em solução de criopreservação [90% SFB e 10% dimetil sulfoxido (DMSO - Sigma-Aldrich)] e mantidas em nitrogênio líquido a – 196°C.

No preparo das células para a realização dos experimentos, as células foram removidas do meio de cultura original, lavadas duas vezes em PBS, ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB. Após a quantificação as células foram ressuspensas na concentração de 1 x 10⁶ células/mL em RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB.

3.2. Cultivo das cepas de BCG

Para a presente proposta foi utilizado o protótipo vacinal *M. bovis* BCG sub-cepça Pasteur 1173P2 transformada com o vetor plasmidial pAU5 contendo o gene *sm14* de *S. mansoni* (BCG/*sm14*). Como controle dos experimentos, foram utilizados a amostra vacinal *M. bovis* BCG sub-cepça Pasteur 1173P2 (BCG-P), assim como o *M. bovis* BCG sub-cepça Pasteur transformado o plasmídeo pAU5 (BCG/pAU5). Os BCGs recombinantes foram desenvolvidos no LATER pelos pesquisadores Dr. Douglas MacIntosh e Msc. Ana Paula C. Argondizzo (Argondizzo 2005) (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Características das cepas de BCG

Cepas	Características
BCG-P	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepça Pasteur 1173P2
BCG/pAU5	<i>M. bovis</i> BCG sup-cepça Pasteur Vetor pAU5: <i>kanR</i> , <i>oriE</i> , <i>oriM</i> , <i>Phsp60</i> *
BCG/ <i>sm14</i>	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepça Pasteur Vetor pAU5/ <i>sm14</i> : <i>kanR</i> , <i>oriE</i> , <i>oriM</i> , <i>Phsp60</i> *, <i>sm14</i>

pAU5 - vetor de expressão citoplasmático

kanR - gene de resistência à canamicina derivado do Tn903

oriE - origem de replicação do bacteriófago T4 de *Escherichia coli*

oriM - origem de replicação do plasmídeo pAL5000 de *Mycobacterium fortuitum*

*Phsp60** - promotor *hsp60* de *Mycobacterium bovis* BCG modificado

sm14: gene de *Schistosoma mansoni*

Os BCGs foram estocados em alíquotas e armazenados a -70°C. No momento do uso as alíquotas foram descongeladas e cultivadas em 20 mL de caldo Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA) suplementado com 10% (v/v) da solução Albumina – Dextrose – Catalase (ADC - Difco), 0,05% (v/v) de Tween 80 (Merck) e 0,2% (v/v) de glicerol (Sigma-Aldrich) a 37⁰ C e 5% CO₂ por 10 dias, quando atingem a fase exponencial de crescimento.

Para o preparo dos inóculos, o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG e BCG-pAU5) foram obtidos a partir de culturas em fase exponencial. Os BCGs foram

centrifugados a 1950 x g e lavados duas vezes em PBS. Após a lavagem, a concentração de cada amostra de BCG foi ajustada com PBS para o padrão 1 da escala de MacFarland (MacFarland, 1907), ou seja, $3,0 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro. Uma alíquota de 10 μ L desta suspensão bacteriana foi quantificada em hemocitômetro por microscopia ótica (100x), para confirmação da leitura por turbidez.

Devido à dificuldade para a determinação da viabilidade dos BCGs em UFC utilizando o meio Middlebrook 7H10 (Difco) suplementado com 10% (v/v) de ADC preparado no laboratório, buscaram-se diferentes alternativas, como a substituição do lote do meio Middlebrook 7H10, utilização do meio Middlebrook 7H11 e suplementação dos meios com ADC e OADC comercial (Difco).

Em cada experimento, o número de bactérias viáveis foi determinado através de plaqueamento de diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) em triplicata, em meio ágar Middlebrook 7H11 (Difco) suplementado com 10% (v/v) da solução de Ácido oléico - Albumina - Dextrose - Catalase (OADC – Difco) e 0,2% (v/v) de glicerol. As placas foram incubadas por quatro semanas em estufa a 37°C em 5% CO₂.

3.3 Avaliação da expressão da proteína recombinante Sm14 em BCG/sm14

Para a confirmação da expressão da Sm14 pela cepa BCG/sm14 foi utilizado a técnica de *western blotting* com base no protocolo descrito por Argondizzo (2005). Amostras de 4 mL das culturas bacterianas foram centrifugadas por 5 minutos a 6500 x g a temperatura ambiente sendo o precipitado rompido por lise mecânica utilizando-se 0,5 g de pérolas de vidro de 0,5 mm de diâmetro (BioSpec Products – Bartlesville, EUA), 60 μ L de tampão Tris-HCl 1 mM 50 mM pH 6.8 e 20 μ L de tampão de amostra 4X (Tris-HCl 50mM pH 6,8, DTT 100mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%). As amostras foram agitadas inicialmente por 45 segundos sendo colocadas em gelo por um minuto e posteriormente agitadas por 30 segundos, utilizando-se o aparato “Mini Beadbeater” (Biospec Products, Bartlesville, Canada). Em seguida, as amostras foram fervidas por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida 13,5% [técnica de SDS-PAGE (Laemmli 1970)] com espaçador de 1 mm. A corrida foi realizada a 100 volts, no gelo. O material do gel foi transferido para membrana de duralose (Duralose – UVTM Membranes – Stratagene, La Jolla, CA, EUA), sendo a transferência realizada por 90 minutos a 90 volts, no gelo.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada em solução de 3% (p/v) de albumina bovina (BSA - Sigma-Aldrich) em PBS pH 7.4 com 0,02% (v/v) de Tween 20 (PBS-T) por um período de 2 horas a temperatura ambiente e sob leve agitação. A seguir a membrana foi incubada com o anticorpo primário policlonal anti-Sm14 (produzido em coelhos New Zealand no Laboratório de Esquistossomose Experimental, Departamento de Helminologia, IOC, FIOCRUZ), diluído 1:500 ou 1:1000. A membrana foi incubada com o anticorpo primário a temperatura ambiente por um período de 16 a 18 horas (*overnight*), a seguir a membrana foi lavada duas vezes com PBS-T por cerca de 40 minutos e duas vezes com PBS pelo mesmo tempo. O anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich), foi diluído na razão 1:30.000 em PBS-T e a membrana incubada por 2 horas sob agitação leve a temperatura ambiente. A seguir procederam-se novamente as lavagens como descrito anteriormente. Após as lavagens, a membrana foi revelada com 5 mL da solução “Western Blue^R Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase” (Promega, Madison, EUA).

3.4 Padronização da multiplicidade de infecção (MOI) do BCG-P

No intuito de verificar a produção de citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α por células THP-1 induzidas por diferentes inóculos de BCG-P, as células foram infectadas numa relação de 5, 10 ou 50 UFC de BCG para cada célula THP-1. Para este ensaio foram definidos apenas dois tempos de infecção: 4 e 24 horas. Foram incubadas 1×10^6 células THP-1 com 5×10^6 , 1×10^7 ou 5×10^7 de BCG-P, em triplicata, mantidos em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB em tubos cônicos de 1,5 mL e incubadas por 4 horas, sob agitação (120 rpm) a 37°C em ambiente com 5% CO₂.

Após este período, as amostras foram centrifugadas a 400 x g e lavadas três vezes com PBS. Após a lavagem, as amostras referentes a avaliação de 4 horas de infecção foram homogeneizadas com 1 mL de meio RPMI 1640, sendo retirados 100 μ L para a recuperação dos BCGs intracelulares, e 900 μ L para avaliação da expressão de citocinas secretadas por células THP-1 infectadas com BCG pela técnica de citometria de fluxo. Já as amostras de 24 horas de infecção, foram homogeneizadas com 1 mL de meio RPMI 1640 com 10% (v/v) de SFB e incubados, sob agitação (120 rpm) a 37°C em ambiente com 5% CO₂ até o término do tempo

proposto (24 horas) sendo posteriormente processadas da mesma forma que as amostras de 4 horas.

Para o acompanhamento da viabilidade dos BCGs intracelulares, nos 100 µL retirados das amostras, foram adicionados 900 µL de tampão PBS com 0,1% (v/v) de Tween 80 (Pro Analysis, Rio de Janeiro) e centrifugados por 10 minutos a 6500 x g, para lisar as células THP-1 e obter os BCGs antes internalizados. O precipitado então foi diluído em 100 µL de meio Middlebrook 7H9 e plaqueado em meio Middlebrook 7H11 para determinação de UFC, como descrito no item 3.2.

3.5 Infecção do BCG/*sm14* e BCGs controles em células THP-1

Os experimentos envolvendo a produção de citocinas em células THP-1 infectadas com BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5) foram realizados como descrito no item 3.4, utilizando MOI de 10 micobactérias para 1 célula THP-1 nos tempos de 4, 24 e 48 horas pós-infecção. Para a análise do perfil de citocinas expressas pela célula THP-1 infectada com as diferentes amostras de BCG utilizaram-se as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo.

3.6 Avaliação da capacidade de proliferação celular da célula THP-1

Para avaliar a capacidade de replicação e a viabilidade celular das células THP-1 infectadas com BCG/*sm14* e os BCGs controles, um cultivo celular foi estabelecido por um período de 24 e 48 horas após a infecção. As células THP-1 foram infectadas com MOI de 10 micobactérias para 1 célula THP-1 como descrito no item 3.3. As amostras contendo $2,5 \times 10^5$ células THP-1 infectadas ou não com os BCGs, foram suspensas em 100 µL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB por poço em placas de 96 poços. Dezesesseis horas antes do término do tempo de infecção, foi adicionado 1µCi de timidina tritiada (Timidina-H³ - Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA) por poço e as placas foram mantidas em estufa a 37°C em ambiente com 5% CO₂. Ao término dos tempos de infecção (24h e 48h) as placas foram congeladas a -20°C até a realização da leitura.

No dia de leitura, as placas foram descongeladas a temperatura ambiente e as amostras foram transferidas através do coletor de células (Cell Harvester - Skation Instruments AS, Lier, Noruega) para o papel de filtro (FilterMAT - Skation Instruments AS). As amostras no papel de filtro foram colocadas em tubos de

cintilação sendo adicionado 1 mL por tubo de solução de cintilação [Difeniloxazol (PPO - Merck), Bis-feniloxasolilbenzeno (POPOP - Merck), Tolueno (Merck)]. As amostras foram contadas em espectrômetro de cintilação líquida (TRI-CARB® 1600 CA, Packard, Milano, Itália) e o resultado expresso em contagem por minuto (cpm).

3.7 Avaliação da estabilidade funcional (expressão do gene *kanR*) do vetor de expressão pAU5 dos BCGr

A confirmação das cepas recombinantes de BCG transformadas com os plasmídeos pAU5 e pAU5-*sm14* foi determinada através do plaqueamento de diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}), em triplicata, dos inóculos utilizados para infecção e dos BCGs recuperados das células THP-1 nos diferentes tempos de infecção (descrito no item 3.4), em meio ágar Middlebrook 7H11 suplementado com 10% (v/v) de OADC e 0,2% (v/v) de glicerol, adicionado ou não de 25 µg/mL de canamicina (Kan - Sigma-Aldrich), para a avaliação da expressão do gene *kanR* contido no vetor de expressão pAU5. As placas foram incubadas por quatro semanas para determinação de UFC em estufa a 37°C em ambiente com 5% CO₂.

3.8 Protocolo de imunocitoquímica para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1

As amostras das células THP-1 infectadas com o BCG/*sm14* e os BCGs controles foram removidas 4, 24 e 48 h após a infecção, centrifugadas a 400 x g, lavadas três vezes com PBS e mantidas em 1mL de PBS.

Utilizando uma centrífuga citológica (Citospin modelo 2400 – Fanem, São Paulo), as células foram transferidas para lâminas de microscopia (Solidor – Médico International Trading Co, Tianjin, China) previamente tratadas com 2 % (v/v) de silano (Sigma-Aldrich) em acetona PA (Merck). De cada amostra, foram adicionados 150 µL em cada orifício seguido de centrifugação a 1800 rpm por 3 minutos.

As células foram fixadas com 4% de paraformaldeído pH 7,4 (Sigma-Aldrich), por 15 minutos, e lavadas em tampão Tris base salina (TBS) com 0,2% (v/v) de Tween20 (Merck), pH 7,4 10 mM (TBS-T) por 10 minutos. A seguir, foram adicionados 50 µL de SFB diluído em TBS-T (1:100) por 30 minutos, com o objetivo de impedir ligações inespecíficas. Após a remoção do soro, foram adicionados 50 µL

dos anticorpos monoclonais primários (Tabela 3.2) diluídos em TBS-T. As lâminas foram incubadas em câmara úmida *overnight* a 4°C.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com TBS-T (3 banhos por 5 minutos cada) e incubadas com 50 µL de anticorpo secundário biotilado (Tabela 3.1). Após 30 minutos, as lâminas foram lavadas com TBS-T em três banhos por 5 minutos cada e foram adicionados 50 µL do complexo estreptoavidina-peroxidase (Dako, Glostrup, Dinamarca) por 30 minutos em câmara úmida, lavando-se em seguida três vezes por 5 minutos cada com TBS-T. Para a revelação, foram adicionados 50 µL em cada amostra da solução de 3-3' diaminobenzidina (DAB - Dako) sendo acompanhada a conversão da tonalidade em microscópio óptico (400 x). A reação foi finalizada mergulhando as lâminas em água destilada e, posteriormente, em água corrente. A seguir, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer (Dako) por 2 minutos, e posteriormente lavadas em água corrente. Logo após, as lâminas foram desidratadas em etanol (Merck) por 10 minutos, diafanizadas em xilol (Merck) por 10 minutos e montadas em “Faramount Mounting Medium, Aqueous” (Dako) entre lamínulas (Corning).

O percentual de células, expressando as citocinas IL-10, IL-12 e TNF-α após infecção com BCG/*sm14*, BCG-P ou BCG/pAU5 por 4, 24 e 48 horas foi determinado pela contagem de células positivas em um campo de duzentas células, utilizando microscopia óptica (1000x).

Tabela 3.2: Anticorpos utilizados no protocolo de imunocitoquímica

Anticorpo Primário	Origem	Diluição	Empresa	Anticorpo Secundário
anti-IL-10 humana	Rato	1:75	Mabtech AB Nacka Strand, Suécia	Coelho anti-rato (Dako)
anti-IL-12 (p70) humana	Camundongo	1:200	Mabtech AB Nacka Strand, Suécia	Kit LSAB – anti-camundongo, anti-coelho e anti-cabra (Dako)
anti-TNF-α humana	Cabra	1:25	R&D Systems Minneapolis, USA.	Kit LSAB – anti-camundongo, anti-coelho e anti-cabra (Dako)

3.9 Protocolo de citometria de fluxo para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1

Os experimentos envolvendo a produção de citocinas em células THP-1 mediada pela infecção com BCG/*sm14* e os BCGs controles foram realizados como descrito no item 3.5. Nas amostras onde a infecção ocorreu por 24 horas e 48 horas foram adicionadas 1 μ L de brefeldina A (BD Biosciences / Becton Dickinson & Company, San Diego, EUA) 4 horas antes do término de cada tempo de infecção, atuando na inibição do complexo de Golgi por este ser o principal centro de distribuição da célula, visando o acúmulo de citocina no interior da célula.

As amostras foram ressuspensas em 50 μ L da solução *Cytofix/Cytoperm* (BD Biosciences), homogeneizadas no agitador de tubos (Fanem) e incubadas por 20 minutos em gelo. Em seguida foram adicionados 150 μ L de PBS, as amostras foram centrifugadas por 10 segundos a 6500 x *g* e ressuspensas em 200 μ L tampão *Perm/Wash* 1X (BD Biosciences) adicionado com 10% (v/v) de soro AB humano (Sigma-Aldrich). Os anticorpos (Tabela 3.2) diluídos no tampão *Perm/Wash* adicionado com 10% (v/v) de soro AB humano foram adicionados as amostras e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram lavadas uma vez com 400 μ L de *Perm/Wash* e uma vez com 400 μ L PBS.

A leitura das amostras foi realizada no citômetro Coulter EPICS XL-MCL (Beckman Coulter, Fullerton, EUA), utilizando o filtro *Band Pass* (BP) de 525 nm para a leitura dos anticorpos marcados com fluorocromo Ficoeritrina (PE) e o filtro BP de 575 nm para leitura do anticorpo marcado com fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Tabela 3.3) e analisadas no programa WinMDI versão 2.8. A seleção da região de interesse (R1) foi realizada em gráficos de distribuição em pontos de tamanho celular relativo (*Foward angle light scatter* - FSC) versus granulosidade celular (*Side angle light scatter* - SSC), de onde foram excluídos tanto restos como grumos celulares, sendo analisado um mínimo de 20 mil eventos por amostra.

Tabela 3.3: Anticorpos utilizados no protocolo de citometria de fluxo

Anticorpo Primário	Origem	Diluição	Empresa	Fluorocromo	Filtros (Band Pass)
anti-IL-10 humana	Rato	1:200	BD Biosciences	PE	575 nm
anti-IL-12 (p70) humana	Camundongo	1:200	BD Biosciences	PE	575 nm
anti-TNF- α humana	Camundongo	1:800	BD Biosciences	FITC	525 nm

4. RESULTADOS

4.1 Cultivo da célula THP-1

Para a padronização da manipulação da célula THP-1 foram determinados parâmetros para o meio de cultivo e manutenção.

4.1.1 Meios de cultivo.

Foram testados, diversos meios de cultura (MEM, D-MEM e RPMI 1640) e suplementos (SFB, HEPES, L-glutamina, NaHCO_3 , 2-mercaptoetanol, piruvato de sódio, estreptomicina/penicilina, gentamicina) e após observação morfológica das células por microscopia óptica (400 x), definiu-se que para os experimentos propostos seria utilizado o meio de cultura RPMI preparado com 0,2% (v/v) de NaHCO_3 , sendo suplementado com SFB nas concentrações de 20% para o descongelamento e 10% para a manutenção e experimentos. O uso de outros suplementos de crescimento como piruvato de sódio e 2-mercaptoetanol não se mostraram necessários (dados não mostrados).

4.1.2 Manutenção

A manutenção da célula THP-1 foi realizada a cada 3-4 dias, contudo, foi estipulado após observação morfológica, que os experimentos seriam realizados com células que estivessem na terceira ou quarta passagem (Figura 4.1). Da mesma forma, para a criação dos lotes de trabalho e reposição do acervo, as células THP-1 seriam mantidas até a oitava passagem.

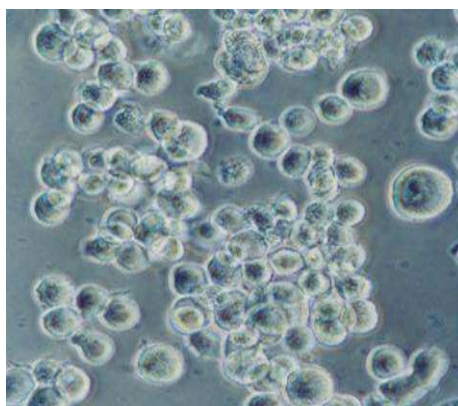


Figura 4.1 Microscopia óptica (200 x) de células THP-1, após três passagens, mantidas em meio RPMI 1640 preparado com 0,2% de NaHCO_3 e suplementado com 10% de SFB.

4.2. Cultivo das cepas de BCG

Para o cultivo das cepas BCG-P, BCG/pAU5 e BCG/sm14 foi utilizado a metodologia usualmente aplicada no LATER (Medeiros 2001, Santos 2002, Argondizzo 2005). Entretanto devido à dificuldade para a determinação da viabilidade dos BCGs em UFC utilizando o meio Middlebrook 7H10 (Difco) suplementado com 10% (v/v) de ADC preparado no laboratório, buscaram-se diferentes alternativas, como a substituição do lote do meio Middlebrook 7H10, utilização do meio Middlebrook 7H11 e suplementação dos meios com ADC e OADC comercial (Difco).

A quantificação dos BCGs obtida, em UFC, após o plaqueamento em diferentes formulações dos meios Middlebrook 7H10 e 7H11, foi confrontada com a quantificação das amostras em hemocitômetro e no ajuste ao padrão 1 do sistema de McFarland. Os resultados demonstraram que os BCGs cultivados em meio Middlebrook 7H11 preparado com 0,2% de glicerol e suplementado com 10% de OADC (Figura 4.2) obtiveram a mesma quantidade de UFC que as amostras ajustadas ao padrão 1 do sistema de McFarland e quantificadas em hemocitômetro.

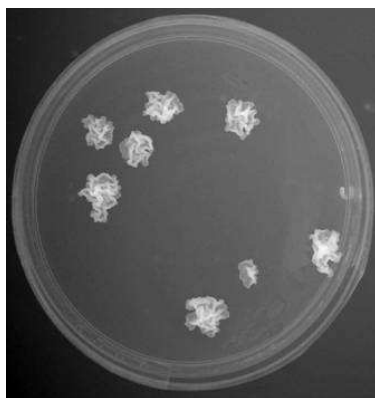


Figura 4.2 Cultura de *M. bovis* BCG Pasteur em meio 7H11 suplementado com 10% de OADC.

4.3 Expressão da proteína Sm14 pelo BCG/*sm14*

A técnica de *Western blot* foi empregada para avaliar a expressão da proteína Sm14 pelos quatro clones da construção BCG/*sm14* utilizados nos experimentos de infecção em células THP-1.

Foi utilizada como padrão (P), 20 ng da proteína Sm14r produzida em *E.coli*, gentilmente cedida pela Dr^a. Miriam Tendler (Laboratório de Esquistossomose Experimental – IOC/Fiocruz) onde em virtude do aquecimento observam-se duas bandas, referentes à proteína Sm14r e seu dímero. Nas linhas 1 a 4 foram aplicados como controle, amostras de 4 clones de BCG/pAU5, onde se observam bandas inespecíficas. Nas linhas 5 a 8 foram aplicadas amostras de 4 clones de BCG/*sm14*, destacando-se em vermelho as bandas correspondentes a proteína Sm14r produzida em BCG, sendo visualizado também o dímero dessa proteína (Figura 4.3).

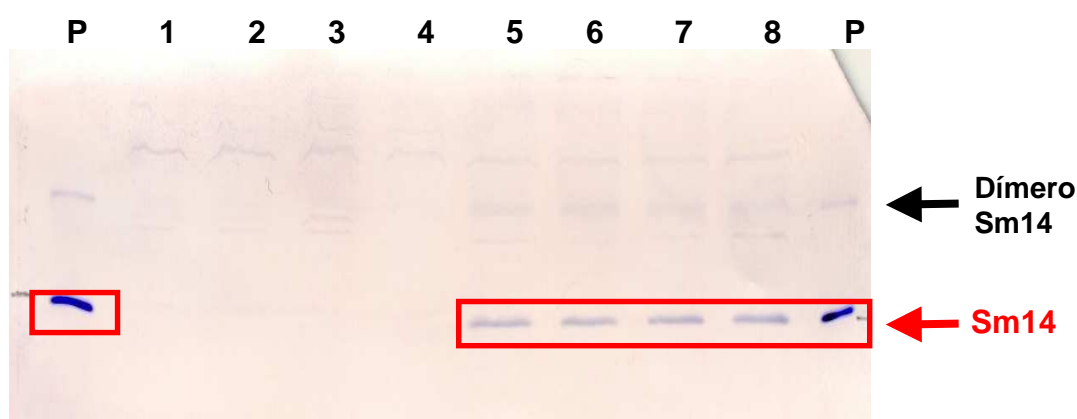


Figura 4.3 Expressão da proteína Sm14 produzida pelos quatro clones de BCG/*sm14* utilizados nos experimentos de infecção (linhas 5-8). Como controle foram usados 20 ng da proteína Sm14 (indicada pela letra P) e as proteínas totais dos quatro clones de BCG/pAU5 utilizados nos experimentos de infecção (linhas de 1-4).

4.4 Multiplicidade de infecção (MOI) BCG:THP-1

Para a determinação da melhor relação micobactéria-célula THP-1 a ser utilizada para se testar os BCG recombinantes, foi utilizada a quantificação da expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α , após 4 e 24 horas de infecção pela técnica de citometria de fluxo. Foi realizado um experimento onde foram testadas três relações micobactéria-célula THP-1: 5, 10 e 50 células de BCG-P para cada célula THP-1. Os resultados evidenciados e demonstrados na figura 4.4, indicam

que um percentual pequeno de células THP-1, mesmo sem estímulos, é capaz de secretar essas citocinas em nível basal (2,9%, 5,3%, 3,0% para IL-10, IL-12 e TNF- α , respectivamente). Estes percentuais permanecem estáveis após 4 horas de infecção com o BCG-P. Entretanto, após 24 horas de infecção com BCG-P, o percentual de células secretando IL-10 foi de 4,8%, 13,4% e 5,7% quando infectadas respectivamente por 5, 10 e 50 micobactérias-célula THP-1, indicando que para esta citocina a melhor relação micobactéria-célula THP-1 é de 10:1 (Figura 4.2). Para IL-12 foi possível observar que 4,8%; 12,7% e 6,1% das células infectadas expressavam esta citocina em resposta à mesma relação micobactéria-célula THP-1. Contudo, observamos um perfil diferente quanto à secreção de TNF- α , 10,5%, 5,97% e 4,23%, indicando que a melhor dose resposta foi obtida com a relação de 5 micobactérias-célula THP-1.

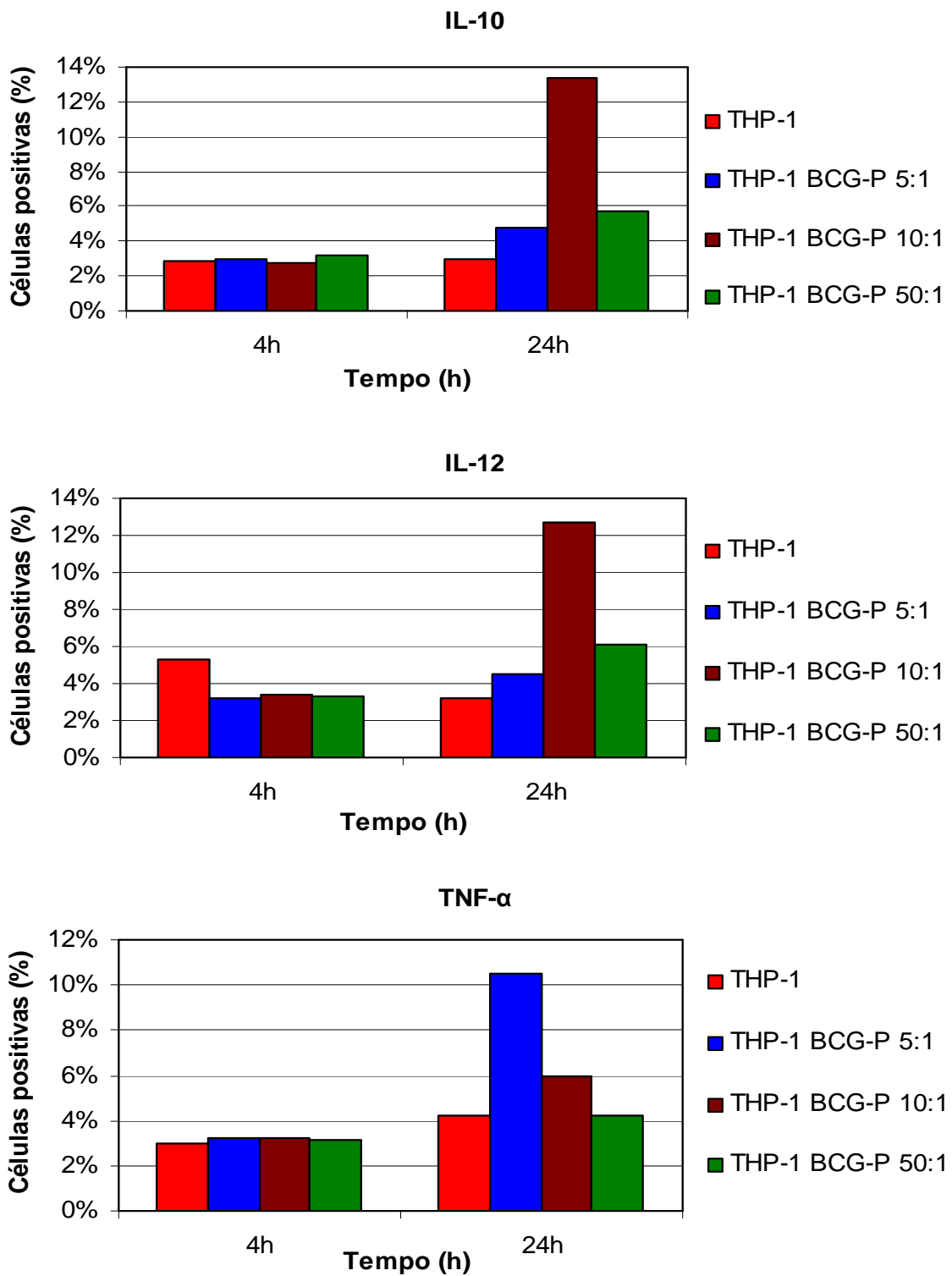


Figura 4.4. Expressão de IL-10, IL-12 e TNF- α em células THP-1 infectadas com *M. bovis* BCG sub-cepa Pasteur 1173P2 utilizando diferentes relações micobactéria-célula.

4.5 Capacidade de proliferação da célula THP-1 infectada pelo BCG/*sm14* e BCGs controles

A avaliação da capacidade de replicação das células THP-1 infectadas ou não pelo BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5) foi realizada pela técnica de proliferação celular através da absorção de timidina tritiada (cintilação). Os resultados obtidos em um experimento demonstram que as células THP-1 tiveram seu crescimento celular reduzido em mais de dois \log_{10} , 24 e 48 horas após a infecção com o BCG/*sm14* e os BCGs controles, não havendo diferença entre os BCGs. Os resultados indicam que a linhagem monocítica THP-1 tem sua diferenciação celular interrompida após infecção com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (Figura 4.5).

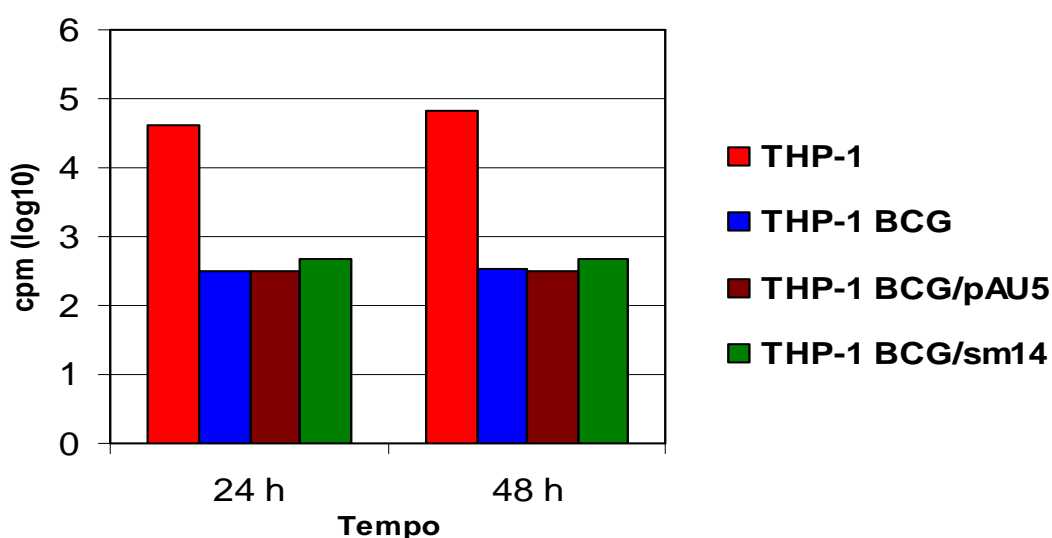


Figura 4.5: Atividade proliferativa das células THP-1 infectadas pelo BCG/*sm14* e pelos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5). Os resultados estão expressos em contagem por minuto (cpm).

4.6 Avaliação da viabilidade e estabilidade funcional (expressão do gene *kanR*) dos BCG/*sm14* e BCGs controles recuperados das células THP-1

A capacidade de infecção e manutenção do crescimento intracelular dos BCGs foi realizada em paralelo aos três experimentos de infecção com as cepas de BCG em células THP-1. A determinação comparativa das UFC dos cultivados em meio 7H11 seletivo (com canamicina – 7H11/Kan) e meio 7H11 não seletivo, permitiu avaliar a estabilidade funcional dos BCGs recombinantes (Figura 4.6).

Foi possível observar que de 3 a 7,5% dos BCGs não foram capazes de penetrar ou permanecerem aderidos a membrana das células THP-1, pois após 4 horas de infecção houve uma redução no número de bacilos utilizados para a infecção (tempo 0). Praticamente não houve diferença entre o número de bacilos recuperados entre o BCG/*sm14* e os BCGs controles, indicando que a presença do plasmídeo não alterou a capacidade dos BCGs recombinantes de penetrarem na célula.

Da mesma forma não observamos diferença entre os BCG/*sm14*, BCG-P e BCG/pAU5 quanto a capacidade de multiplicação intracelular, visto a manutenção entre o número de UFC recuperadas após 24 horas ($5,4 \log_{10}$, $5,7 \log_{10}$ e $5,4 \log_{10}$) e 48 horas ($5,3 \log_{10}$, $5,6 \log_{10}$ e $5,2 \log_{10}$). Uma redução entre 0,1 e $0,3 \log_{10}$ foi observada entre o período basal de 4 horas e após 24 e 48 horas.

Na avaliação da estabilidade funcional dos BCGs recombinantes, observamos que não houve diferença expressiva entre o cultivo dos BCG/*sm14* e BCG/pAU5 nos meios Middlebrook 7H11 e 7H11/Kan em todos os tempos avaliados. Como controle do meio seletivo, foram plaqueadas amostras de BCG, não sendo observado nenhum crescimento.

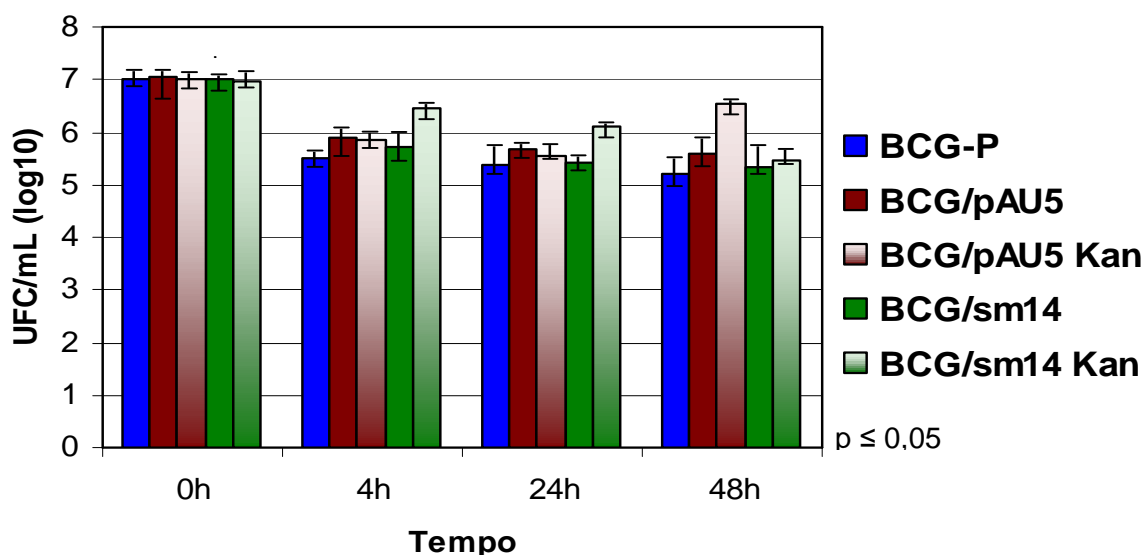


Figura 4.6 Gráfico da cinética da viabilidade do protótipo vacinal BCG/sm14 e dos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), recuperados de células THP-1 e cultivados nos meios Middlebrook 7H11 e 7H11/Kan (Três experimentos em triplicata).

4.7. Avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção do BCG/sm14 e BCGs controles em células THP-1 por imunocitoquímica

Para a detecção intracelular das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α produzidas pela infecção com BCG/sm14, BCG-P e BCG/pAU5 nas células THP-1 pela técnica de imunocitoquímica, com base na dissertação da Msc. Ana Teresa Gomes Fernandes (Fernandes 2003). Devido às dificuldades de adaptação deste procedimento à técnica de imunocitoquímica, foram avaliados diferentes parâmetros como condições de incubação dos anticorpos primários (1 hora a 25°C ou *overnight* a 4°C), tampões (HBSS, TBS-T, PBS-Saponina) e fixadores (paraformaldeído 4% ou acetona PA). Após observação morfológica por microscopia óptica (1000 x), determinou-se que os anticorpos primários deveriam ser incubados com as amostras a 4°C por 16-18 horas (*overnight*), sendo utilizado o tampão TBS-T e as amostras fixadas com paraformaldeído 4%.

Foi possível identificar por esta metodologia a produção de citocinas pelas células THP-1 (Figura 4.7). O percentual de células expressando cada citocina foi determinado após 4, 24 e 48 horas de infecção pelo BCG-P, BCG/pAU5 e BCG/sm14 através da média de três experimentos, sendo demonstrado o desvio padrão pela barra de erro. A expressão basal destas citocinas foi também determinada em células não infectadas, onde se observou que a citocina IL-10 foi

expressa por 5,0%, 10,7% e 6,4% das células THP-1, sendo que 8,8%, 8,2% e 3,4% produziram IL-12 e 3,6%, 6,5% e 2,2% expressaram TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente. Após a infecção com BCG-P, 5,9%, 6,5% e 5,5% expressavam IL-10; 9,45%, 4,6% e 6,1% expressaram IL-12 e 6,8%, 6,4% e 5,2% TNF- α , durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente. Na infecção de células THP-1 com o recombinante controle BCG/pAU5, 7,3%, 9,9% e 2,9% expressaram IL-10, na produção de IL-12 foram observados 9,9%, 8,3% e 7,1% de células e 4,1%, 5,5% e 1,5% de células produziram TNF- α . Durante a infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, foram detectadas 5,3%, 9,3% e 6,2% de células expressando IL-10; 9,4%, 10,4% e 4,3% de células produtoras de IL-12 e 4,5%; 7,1% e 6,0% de células fabricantes de TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente (Figura 4.7).

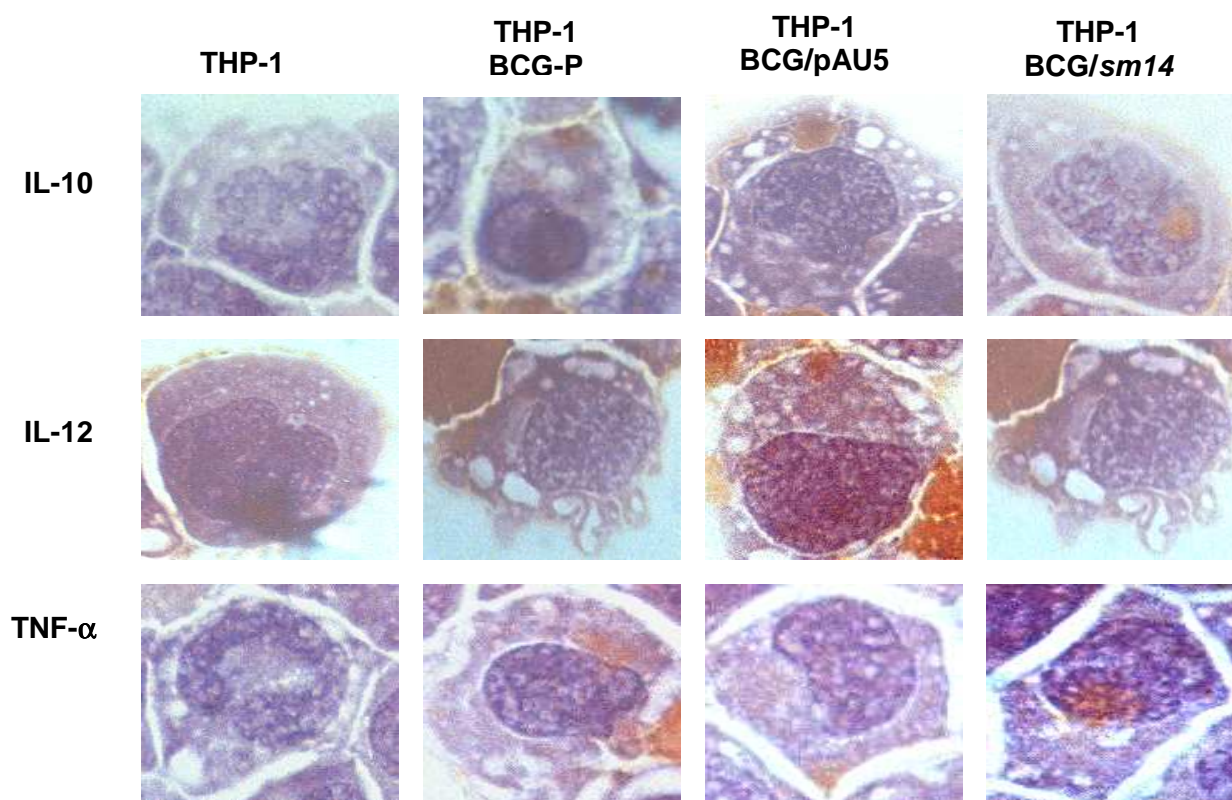


Figura 4.7 Microscopia óptica (1000 x) de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após 24 horas de infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), detectadas por imunocitoquímica.

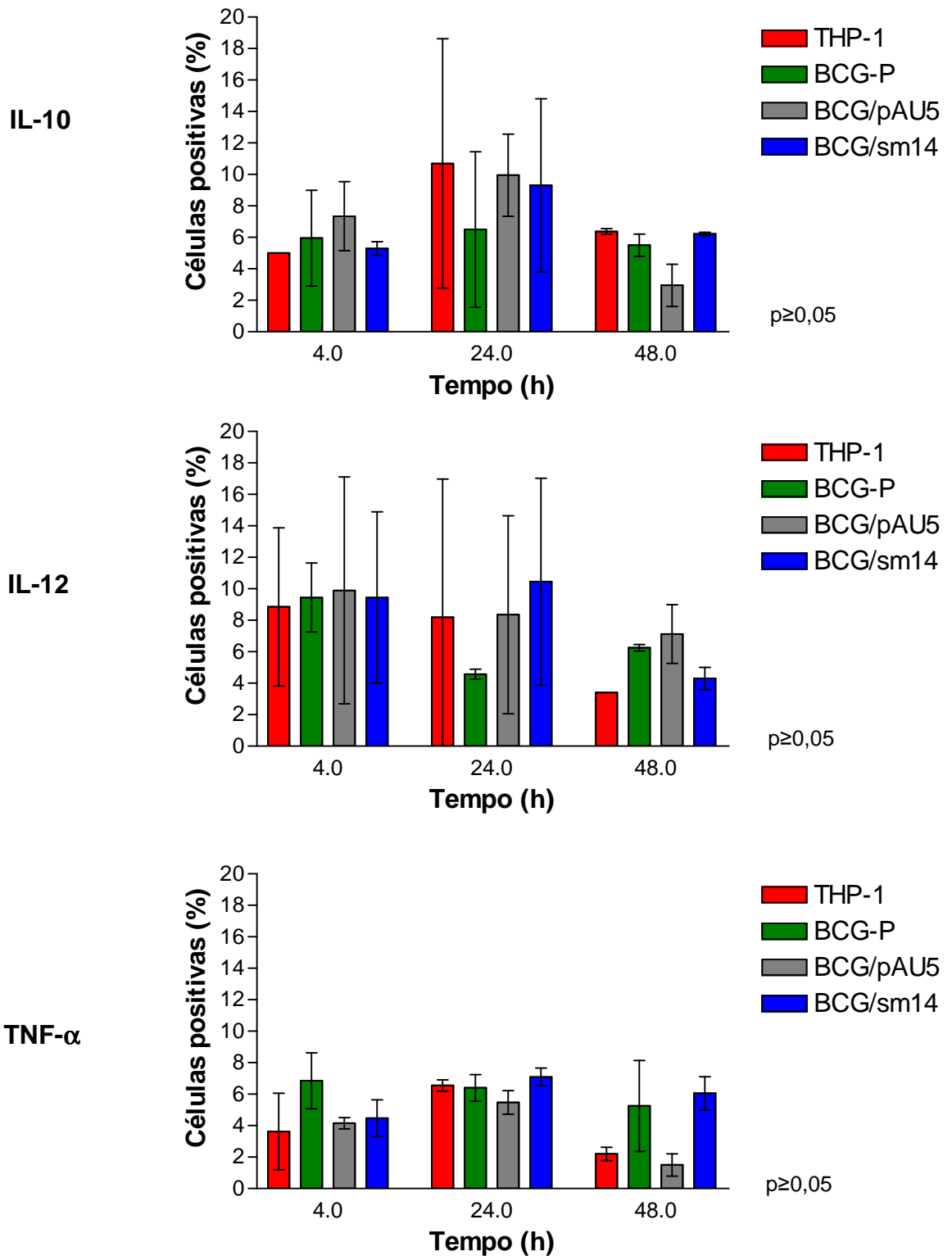


Figura 4.8 Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por imunocitoquímica (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

4.8 Avaliação das citocinas a partir da infecção do BCG/*sm14* e BCGs controles em células THP-1 por Citometria de Fluxo

Para a detecção intracelular das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α produzidas pela célula THP-1 e pela infecção com BCG/*sm14*, BCG-P ou BCG/pAU5 em células THP-1 pela técnica de citometria de fluxo, inicialmente foi determinada a região de análise a partir da leitura de uma amostra das células THP-1 incubada a 37°C em ambiente com 5% CO₂ por 4 horas, sendo comparada a relação tamanho/granulosidade, objetivando excluir tanto restos celulares quanto grumos celulares (Figura 4.8).

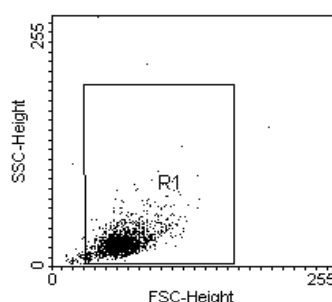


Figura 4.9 Determinação da região de análise das células THP-1 mantidas em cultivo celular. A região de análise (R1) foi determinada excluindo-se os restos celulares. Pode-se observar uma grande variabilidade quanto ao tamanho das células, visto se tratar de células em diferenciação.

Os resultados estão expressos nas figuras 4.9 a 4.12, mostrando a média de três experimentos, sendo evidenciado o desvio padrão pela barra de erro. Na detecção da produção de citocinas pelas células THP-1 sem estímulos, observou-se que a citocina IL-10 foi expressa por 3,2%, 8,1% e 11,4% das células THP-1, sendo que 2,7%, 4,6% e 8,1% das células THP-1 produziram a citocina IL-12 e 3,0%, 5,9% e 5,4% das células THP-1 expressaram TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas.

A infecção com BCG-P em células THP-1 gerou durante os tempos de infecção, 3,3%, 6,9% e 13,4% de células produtoras de IL-10; 2,0%, 5,5% e 12,0% de células expressando IL-12 e 4,2%, 5,4% e 11,4% de células sintetizando TNF- α .

Na infecção com o controle BCG/pAU5 em células THP-1, 3,3%, 6,2% e 12,3% expressaram IL-10, na produção de IL-12 foram detectados 4,3%, 4,6% e 10,2% de células e 4,0%, 3,9% e 11,3% de células produziram TNF- α .

Durante a infecção do BCG/*sm14* em células THP-1, foram detectados 3,2%, 7,9% e 12,9% de células expressando IL-10; 3,1%, 4,8% e 9,0% de células produtoras de IL-12 e 2,7%, 3,4% e 11,4% de células fabricantes de TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente.

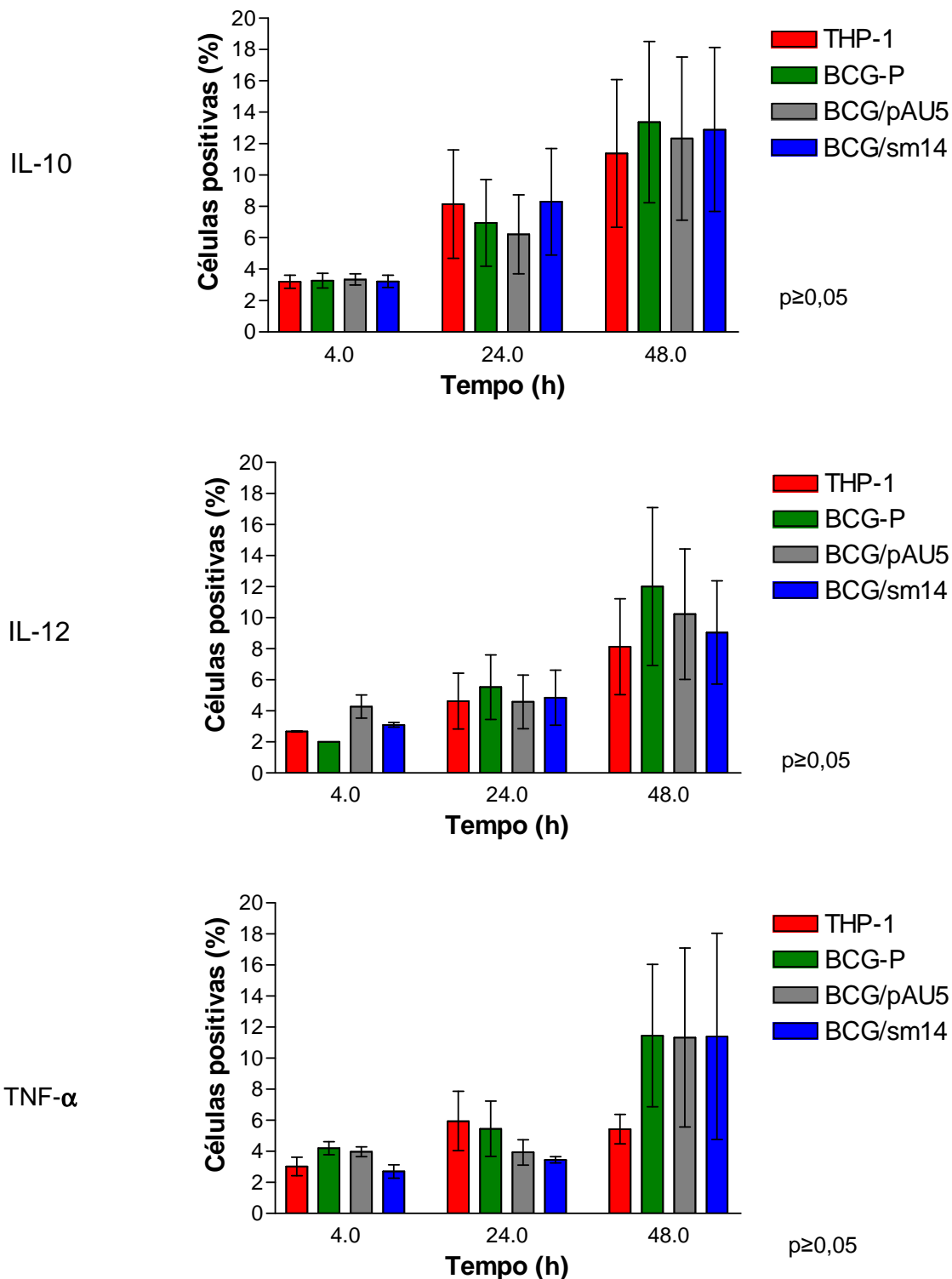


Figura 4.10: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 TNF- α e após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por citometria (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

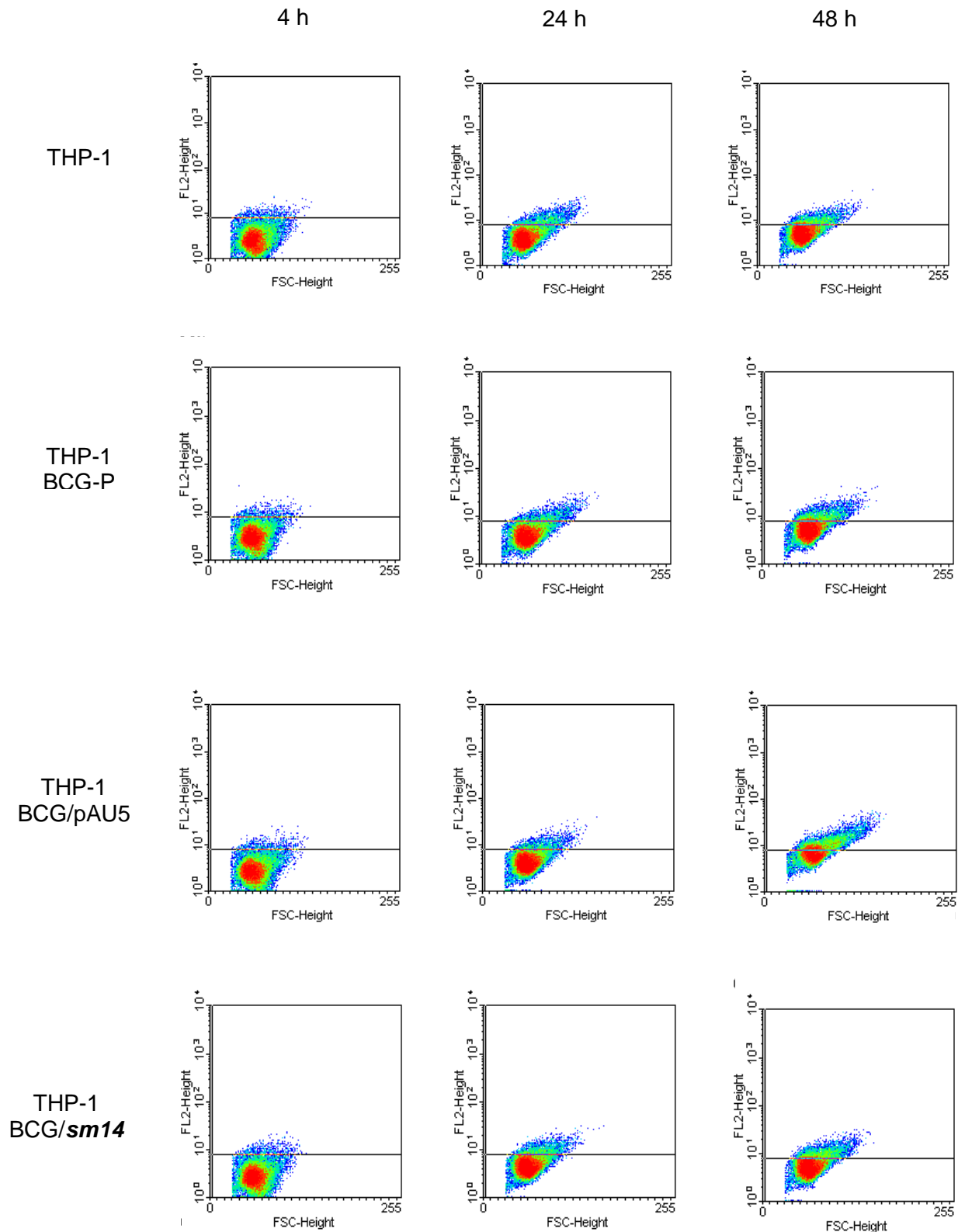


Figura 4.11: Gráfico tamanho (FSC) *versus* fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria (Experimento III).

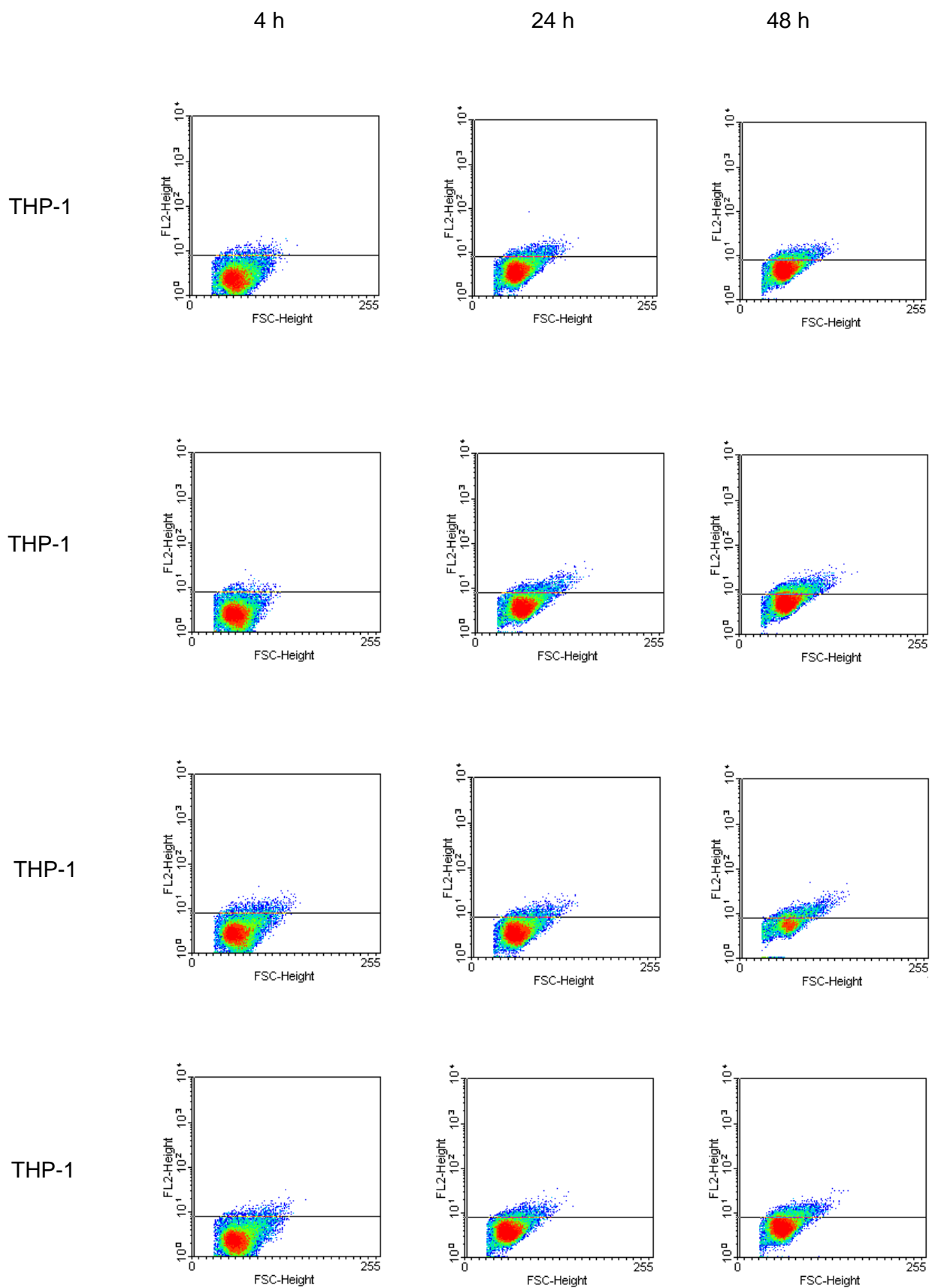


Figura 4.12: Gráfico tamanho (FSC) versus fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/sm14 e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por citometria (Experimento III).

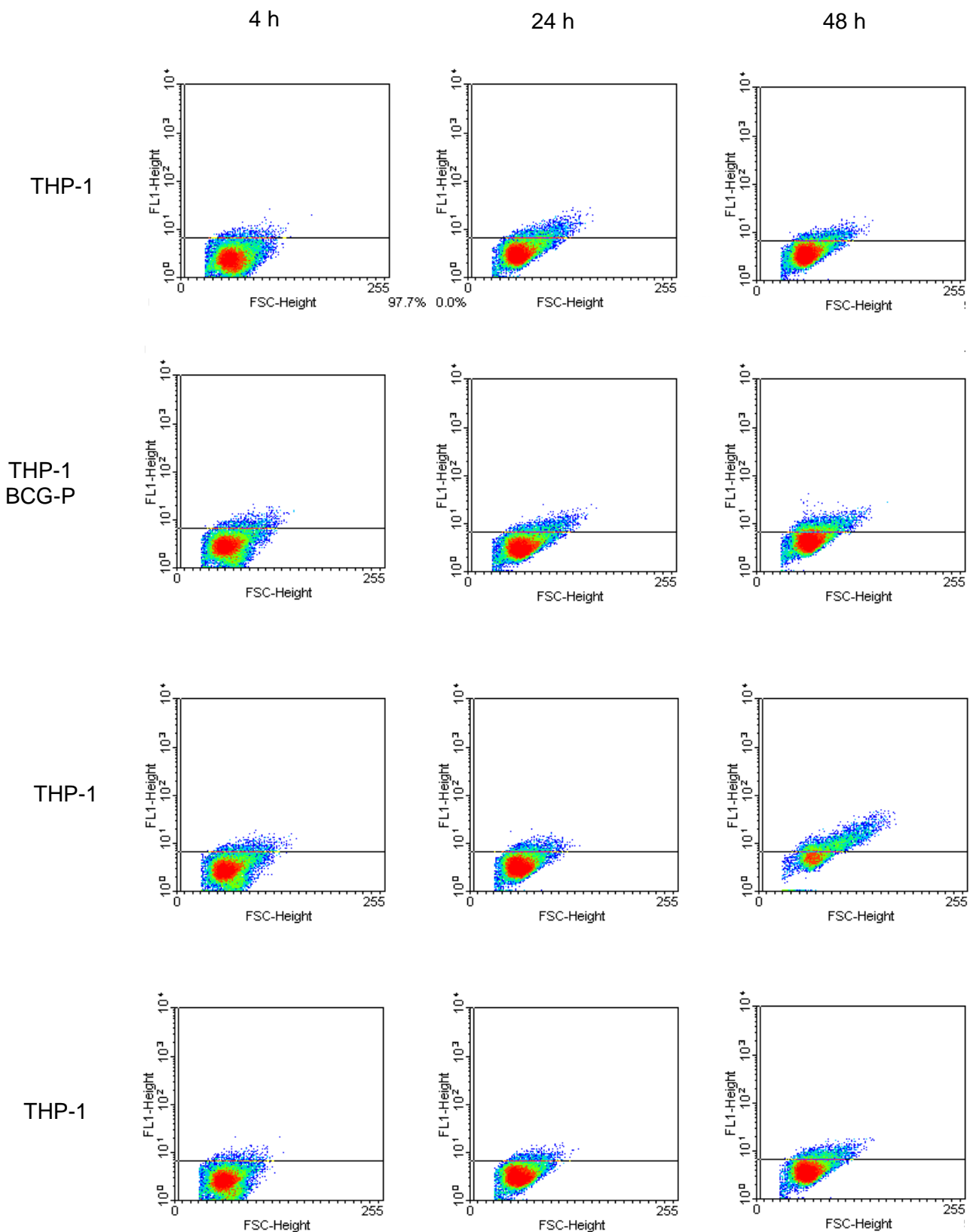


Figura 4.13: Gráfico tamanho (FSC) *versus* fluorescência (FL1 ou FL2) da avaliação de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por citometria (Experimento III).

4.9 Comparação entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo

As células THP-1 infectadas ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles foram avaliadas quanto à produção das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α durante os períodos de 4, 24 e 48 horas, pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo.

4.9.1 Detecção de IL-10

A detecção de células THP-1 produtoras de IL-10 a partir da infecção ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), estão apresentadas na figura 4.13. Nas células THP-1 não infectadas, observa-se uma variação entre 1,8% e 2,6% de células positivas na avaliação pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo nos tempos de 4 horas (5,0% e 3,2%, respectivamente) e 24 horas (8,1% e 10,7%, respectivamente), ocorrendo uma inversão na variação do número de células produtoras de IL-10, no período de 48 horas (6,4% e 11,4%, respectivamente).

Na infecção com BCG-P em células THP-1 revela-se que no período de 4 horas há variação do número de células positivas detectadas pelas duas técnicas (5,9% imunocitoquímica e 2,0% citometria). Já nos períodos de 24 e 48 horas evidencia-se uma variação de 1,0% (5,5% e 6,5%, respectivamente), sendo observado de forma similar às células THP-1 uma inversão entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (5,5% e 12,0%, respectivamente).

Na infecção com BCG/pAU5 em células THP-1 avista-se uma variação de 4,0% do número de células positivas (7,3% e 3,3%, respectivamente) em 4 horas de infecção. No tempo de 24 horas, mantém-se a variação (9,9% e 6,2% respectivamente). No entanto, no tempo de 48 horas de infecção, a porcentagem de células expressando IL-10 detectada pela técnica de imunocitoquímica diminui para 2,9% enquanto pela técnica de citometria de fluxo, aumenta praticamente quatro vezes em relação à porcentagem observada no tempo de 24 horas (12,3%).

Na infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, nos tempos de 4, 24 e 48 horas, avalia-se inicialmente uma variação de 2,1% na detecção de IL-10 pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (5,3% e 3,2%, respectivamente) no tempo de 4 horas. No tempo de 24 horas visualizamos uma pequena queda na variação dos valores obtidos entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria

(9,3% e 7,9% respectivamente). observa-se uma inversão do número de células positivas no tempo de 48 horas (6,2% e 12,9% respectivamente).

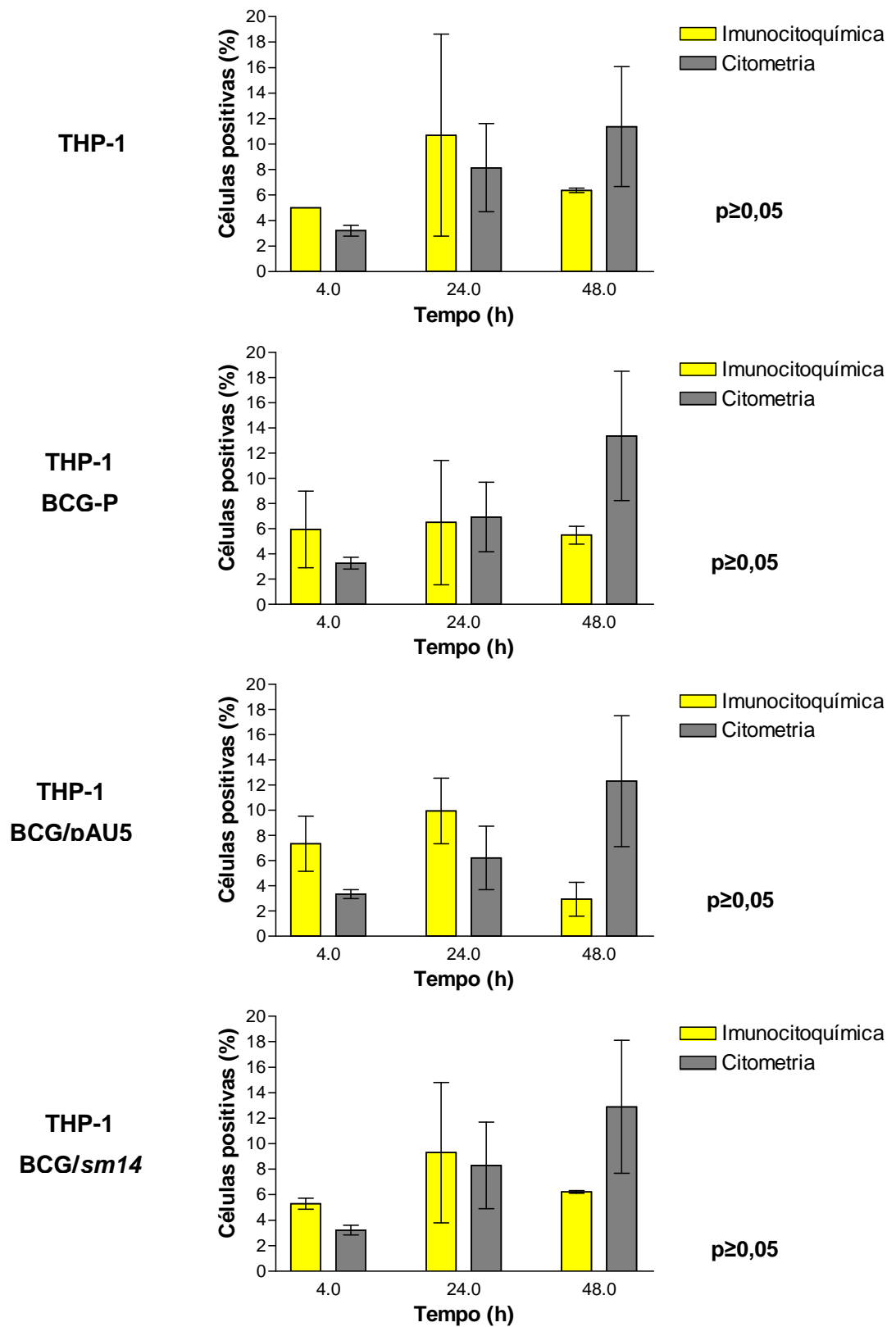


Figura 4.14: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por imunocytoquímica e citometria de fluxo (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

4.9.2 Detecção de IL-12

A detecção de células THP-1 produtoras de IL-12 a partir da infecção ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), estão apresentadas na figura 4.14. Nas células THP-1 não infectadas, observa-se uma variação na detecção de células positivas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (8,8% e 2,7%, respectivamente). No período de 24 horas, mantém-se praticamente inalterado o número de células produtoras de IL-12 avaliado pela técnica de imunocitoquímica (8,2%) e um aumento na porcentagem de células positivas avaliados pela técnica de citometria de fluxo (4,6%). No tempo de 48 horas as porcentagens de células THP-1 positivas foram de 3,4% e 8,1% nas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

Na infecção com BCG em células THP-1 revela-se que no período de 4 horas, os valores obtidos foram de 9,4% e 2,0% de células positivas identificadas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria, respectivamente. No período de 24 horas evidencia-se um decréscimo de 4,8% de células avaliadas pela técnica de imunocitoquímica (4,6%) e um aumento de 3,5% de células avaliadas pela técnica de citometria de fluxo. A mesma tendência de inversão na variação dos valores obtidos pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria no tempo de 48 horas após infecção é evidenciado (6,1% e 12,0%, respectivamente).

Na infecção com BCG/pAU5 em células THP-1 avista-se uma variação do número de células positivas detectadas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria no tempo de 4 horas (9,9% e 4,3%). Após 24 horas de infecção, ocorre uma diminuição de 1,6% do número de células positivas determinadas pela técnica de imunocitoquímica e aumento de 0,3% de células positivas avaliadas pela técnica de citometria. Já no tempo de 48 horas de infecção, a porcentagem de células expressando IL-12 detectada pela técnica de imunocitoquímica diminuiu para 7,1% e pela técnica de citometria de fluxo a porcentagem de células positivas aumentou para 10,2%.

Na infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, observa-se uma variação de mais de 6,0% na detecção de IL-12 pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (9,4% e 3,1%, respectivamente) no tempo de 4 horas. No tempo de 24 horas há um aumento de 1,0% no número de células positivas detectadas pela técnica de imunocitoquímica (10,4%) semelhante ao aumento de 1,7% detectado pela técnica de citometria de fluxo (4,8%). Em 48 horas de infecção, foram

detectados 4,3% e 9,0% de células produtoras de IL-10 pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

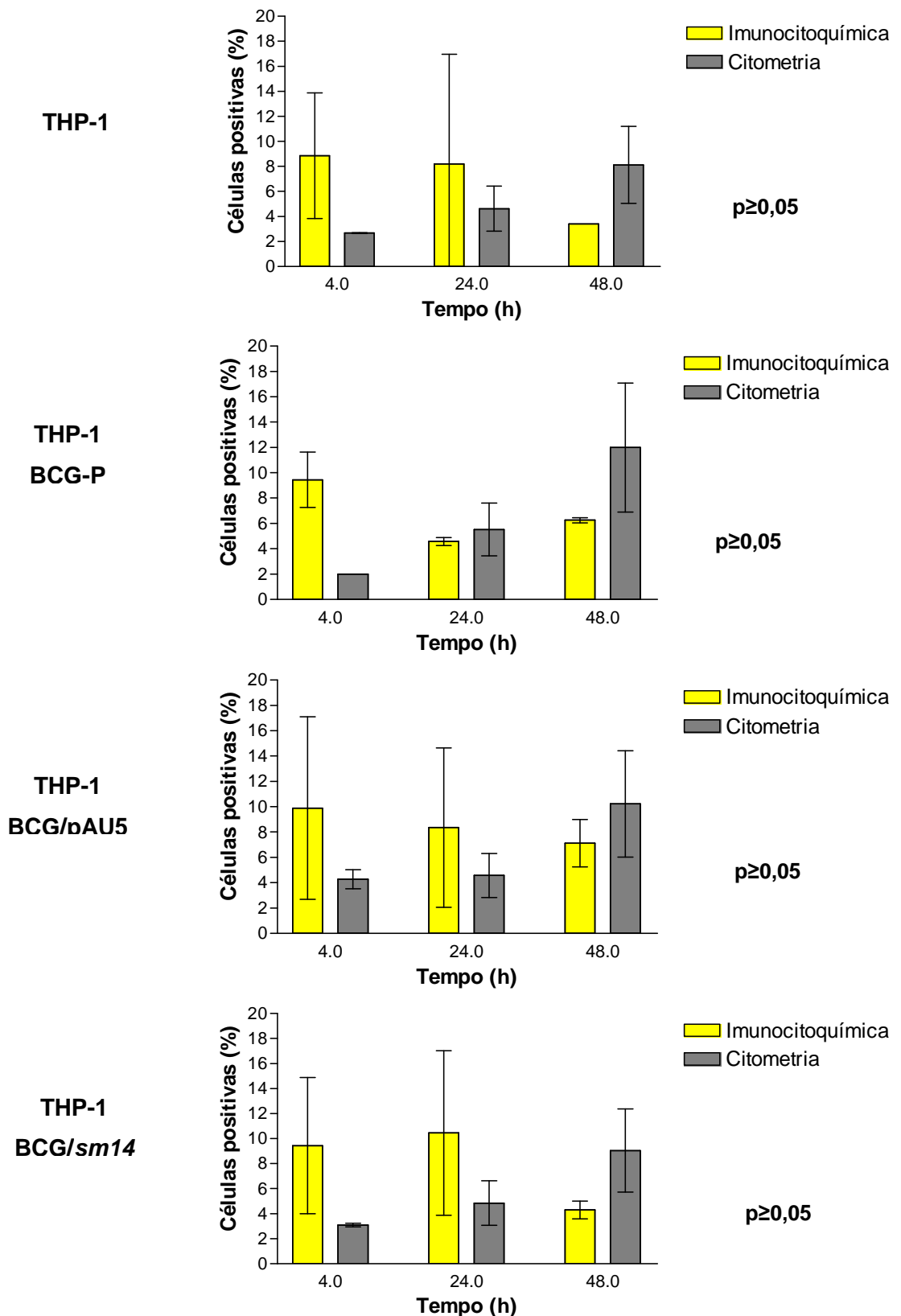


Figura 4.15: Percentagem de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

4.9.3 Detecção de TNF- α

A detecção de células THP-1 produtoras de TNF- α a partir da infecção ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), estão apresentadas na figura 4.15. Nas células THP-1 não infectadas, detecta-se no período de 4 horas os valores de 3,6% e 3,0% de células positivas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente. No tempo de 24 horas, ocorre um aumento do número de células produtoras de IL-12 avaliado tanto pela técnica de imunocitoquímica (6,5%) como pela técnica de citometria de fluxo (5,9%). No tempo de 48 horas as porcentagens de células THP-1 positivas foram de 2,2% e 5,4% nas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

Na infecção com BCG em células THP-1 revela-se que no período de 4 horas os valores detectados de células positivas pelas duas técnicas foram de 6,8% pela técnica de imunocitoquímica e 3,0% pela técnica de citometria de fluxo. Já nos períodos de 24 e 48 horas evidenciam-se 6,4% e 5,2%, respectivamente, de células positivas na leitura pela técnica de imunocitoquímica. Nesses mesmos períodos, os valores da leitura pela técnica de citometria de fluxo os valores de células produtoras de TNF- α foram semelhantes (5,9% e 5,4% respectivamente).

Na infecção com BCG/pAU5 em células THP-1 avistam-se os valores de 4,1% e 4,0% de células positivas em 4 horas de infecção pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente. No tempo de 24 horas, há um aumento do número de células expressando TNF- α detectadas pela técnica de imunocitoquímica enquanto pela citometria de fluxo o valor de células positivas mantém-se inalterado (5,5% e 3,9%, respectivamente). Já no tempo de 48 horas de infecção, a porcentagem de células expressando TNF- α detectada pela técnica de imunocitoquímica diminui para 1,5% e na técnica de citometria de fluxo aumenta consideravelmente em relação à porcentagem observada nos tempos de 4 e 24 horas (11,3%).

Na infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, nos tempos de 4, 24 e 48 horas, observa-se inicialmente os valores de 4,5% e 3,1% de células produtoras de TNF- α identificadas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo no tempo de 4 horas de infecção. No tempo de 24 horas há um aumento de células positivas detectadas em ambas as técnicas (7,1% e 4,8% respectivamente). Em 48 horas de infecção, foram detectadas 6,0% e 9,0% de células produtoras de TNF- α pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

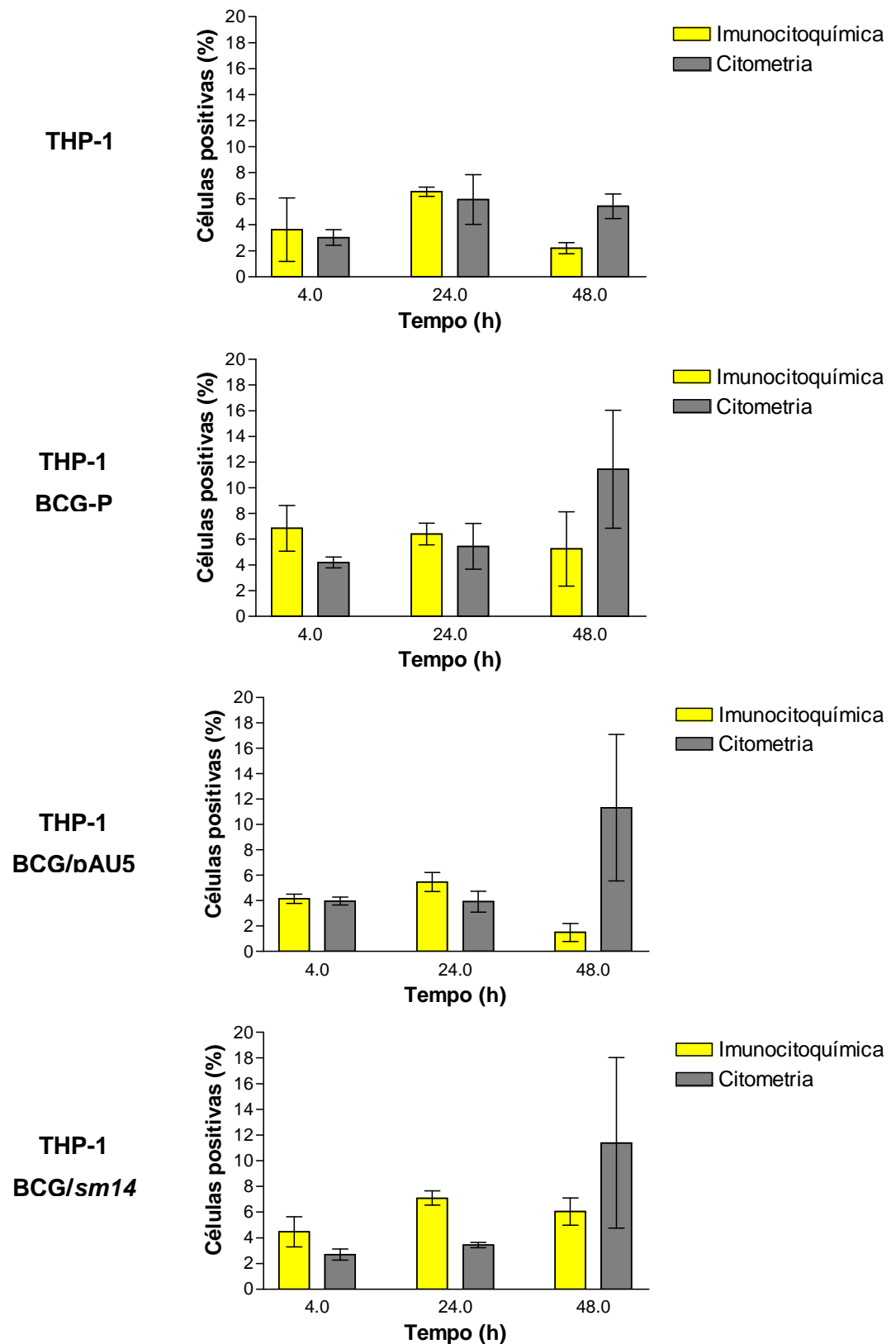


Figura 4.16: Percentagem de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

Os resultados obtidos por ambas as técnicas, apesar de divergentes entre si, não permitiram identificar diferenças no perfil de citocinas fabricadas pelas células THP-1 infectadas pelo BCG/*sm14* e pelos BCGs controles.

5. DISCUSSÃO

Devemos considerar alguns pontos importantes para se estudar a resposta imune desencadeada por protótipos vacinais, bem como sua eficácia. Dentre eles, podemos indicar a impossibilidade de se realizar experimentos em seres humanos sem prévios estudos *in vitro* em células humanas e/ou de animais e *in vivo* em animais de experimentação, apesar de sabermos que estes não reproduzem fielmente toda a gama de indução da resposta imune observado no homem (Metz *et al* 2002). Outras questões sobre o uso de animais em experimentação envolvem o benefício potencial contraposto ao sofrimento animal, aspectos legais, morais e éticos. Por estas razões um grande esforço vem sendo realizado na busca de métodos alternativos que sejam capazes de substituir, diminuir ou refinar os métodos de utilização de animais em experimentação, conforme descrito na teoria dos “3 Rs” – *Replacement* (substituição), *Refinement* (refinamento) e *Reduction* (redução) - descrita por Russell e Burch em 1959 (Dellepiane, Griffiths & Milstien 2000, Metz *et al.* 2002, Presgrave 2003).

A grande pressão internacional sobre as indústrias de fármacos, cosméticos e imunobiológicos que são grandes usuárias de animais no desenvolvimento, produção e testes de eficácia e segurança de produtos no sentido de buscarem a validação e aplicação de novas técnicas baseadas nos 3Rs, levou a criação de órgãos como o *Fund for Replacement of Animal Medical Experiments* (FRAME) que, desde 1983, edita uma revista internacional intitulada *Alternatives to Laboratory Animals* (ATLA). Em 1994, foi inaugurado o Centro Europeu para a validação de métodos alternativos (*European Centre for the Validation of Alternative Methods* - ECVAM). Outras instituições, como *Cosmetic, Toiletries and Frangrance Association* (CTFA), *Interagency Regulatory Alternatives Group* (IRAG), *Food and Drug Administration* - EUA (FDA) também atuam nos estudos de relevância e confiabilidade de propostas alternativas, pela pesquisa dos métodos atualmente utilizados e o desenvolvimento e validação de novos testes, para que os produtos químicos e os produtos de várias espécies possam ser manufaturados de forma mais segura e econômica, visando reduzir o uso e minimizar o sofrimento dos animais (Balls 2002, Hendriksen 2005).

Um dos métodos alternativos para substituição ou pelo menos diminuição do uso de animais nas fases de desenvolvimento, produção e testes de algumas vacinas é a adoção de sistemas de ensaios *in vitro*, dentre os quais podemos

destacar o uso de cultura de células (Metz *et al* 2002, Presgrave 2002, Presgrave 2003). A principal vantagem da utilização *in vitro* de cultivos celulares é o controle do ambiente de cultura, podendo-se controlar condições físico-químicas (pH, temperatura, pressão osmótica, níveis de oxigênio (O₂) e CO₂, tensão superficial) e fisiológicas (hormônios, fatores de crescimento, densidade celular), que podem ser mantidas relativamente constantes (Doyle & Griffiths 1998, Freshney 2000a). Outras vantagens relevantes são: a homogeneidade das células em cultivo em relação à morfologia e especificidades uniformes, podendo com facilidade obter um número elevado de réplicas idênticas, superando assim o problema de heterogeneidade de amostras, reduzindo a variação e o custo dos experimentos, possibilitando a realização de múltiplos testes com muitas variáveis (Doyle & Griffiths 1998, Freshney 2000a).

A técnica de cultura de células integrada com sistemas computacionais e a hierarquização de métodos podem ser ferramentas importantes para etapas do desenvolvimento de protótipos vacinais (Figura 5.1), sendo utilizada principalmente para procedimentos de seleção (*screening*) de vacinas candidatas na fase pré-clínica (Henriques & Sampaio 2002, Larsen 2005).

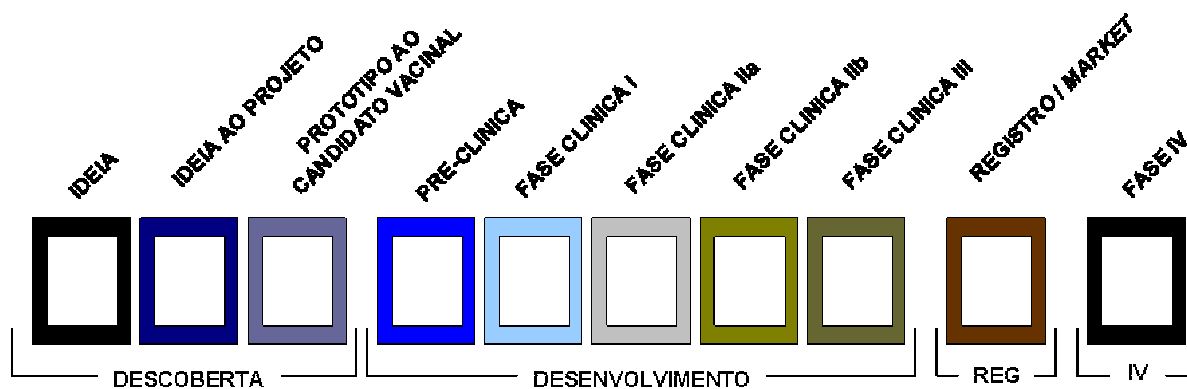


Figura 5.1: Modelo esquemático das etapas necessárias para implantação de novos fármacos e imunobiológicos (Adaptado de Larsen 2005).

Este estudo visou o desenvolvimento de um protocolo para a seleção de protótipos vacinais utilizando como modelo *M. bovis* BCG sub-cepça Pasteur expressando o antígeno Sm14 de *Schistosoma mansoni* e a linhagem de monócitos humanos THP-1 como substrato celular. Contudo, a eficiência da resposta imune induzida por BCGs recombinantes é dependente da capacidade de expressão da proteína heteróloga, uma vez que essa expressão pode interferir na

ativação celular. Assim, confirmamos a expressão da proteína Sm14 por todos os clones do protótipo vacinal BCG/*sm14*, e nossos resultados corroboram com relatos anteriores Argondizzo (2005), utilizando o mesmo sistema de expressão. Desta forma, assumimos que todos os recombinantes BCG/*sm14* estavam expressando a proteína de interesse em quantidade suficiente para o prosseguimento dos experimentos de infecção com os protótipos vacinais em linhagens monocíticas.

Para a realização dos ensaios de infecção de células THP-1 com o BCG/*sm14*, foi necessário determinar a MOI capaz de induzir a melhor dose resposta para a expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α . Assim sendo, foram avaliadas três diferentes relações, 5, 10 e 50 BCGs para cada célula THP-1. Os resultados obtidos mostram que o fato da MOI de 50 BCG:THP-1 não ter estimulado adequadamente a expressão de citocinas, sugere que esta concentração de BCG promove perda da viabilidade de células THP-1 (Hassan *et al* 2006). Por outro lado, a MOI de 10 de BCG/THP-1 estimula uma maior porcentagem de células produtoras de IL-10 e IL-12, tendo sido considerada, portanto a melhor dose-resposta para a síntese das citocinas neste estudo. Entretanto, ao contrário do observado por Oliveira, Charlab & Pessolani (2001), que na análise das MOI de 1, 10 e 100 de BCG e *M. leprae* para cada célula THP-1, concluíram que a relação de 10:1 de micobactérias-célula THP-1 induz uma maior produção de TNF- α , no presente trabalho a MOI de 5 BCGs apresentou o melhor resultado com relação às células produtoras de TNF- α . Atkinson e colaboradores (2000), realizaram de forma semelhante uma pesquisa do perfil de citocinas (IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α) expressas por linhagem primária de macrófagos humanos infectadas com MOI de 0,2, 1 e 5 BCGs, concluindo que a MOI de 5 BCG/célula induz de forma eficiente a expressão das citocinas IL-10 e TNF- α por macrófagos infectados. Devido a divergências entre os resultados obtidos neste trabalho e os resultados relatados na literatura para determinar a relação padrão para avaliação de citocinas a partir da interação BCG-macrófago, e como o maior percentual de células expressando IL-10 e IL-12 foi atingido com a relação de 10 BCG para cada célula THP-1, optamos por usar esta proporção nos ensaios de imunocitoquímica e citometria para a quantificação das células produtoras de citocinas infectadas com o protótipo vacinal BCG/*sm14*.

Dentre os requerimentos para se determinar o sucesso de protótipos vacinais está a indução e ativação das APCs, que irão realizar o processamento de antígenos, a expressão de fatores co-estimulatórios, secreção de citocinas e a

apresentação antigênica às células T, tornando-se essenciais para o desencadeamento da resposta imune (Ada 2004). Neste contexto, utilizamos uma linhagem de monócitos humanos como modelo para infecção, recuperação e análise do perfil de citocinas (IL-10, IL-12 e TNF- α) expressas em células THP-1 após infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14*. Vários autores têm utilizado esta linhagem celular como modelo de averiguação do perfil de ativação celular em monócitos (Diaz-Silvestre *et al.* 2005, Xia *et al.* 2005, Ciabattini *et al.* 2006) ou células maduras – macrófagos (Oliveira, Charlab & Pessolani 2001, Lewis *et al.* 2003, Theus, Cave & Eisenach 2004, Theus, Cave & Eisenach 2005, Hasan *et al.* 2006).

Da mesma forma, autores como Takahashi (2003), Ada (2004) e Plotkin (2005a), destacam que o reconhecimento e a ativação das APCs podem ser considerados como etapas relevantes para avaliação de protótipos vacinais e para o sucesso vacinal. Os monócitos são importantes células efetoras capazes de responder rapidamente a estímulos imunes de diferentes formas, como produção de proteínas inflamatórias, expressão de moléculas de adesão em sua superfície, ativação e diferenciação em macrófagos. Neste contexto, utilizamos a cintilografia para o acompanhamento da proliferação da célula THP-1 infectada ou não com o protótipo vacinal BCG/*sm14*, com a amostra vacinal de BCG Pasteur e com a construção BCG/pAU5. A medição de partículas beta emitidas pela timidina-H³ captada pelas células THP-1, nos permite determinar a capacidade do protótipo vacinal de ativar as células THP-1 e modificar seu estado de célula jovem, indiferenciada (monócitos) e transformá-las em células ativadas (macrófagos), a partir da redução de sua capacidade de replicação (Bennett *et al.* 1993). Nas condições avaliadas, nossos resultados mostram que as amostras de BCGs utilizadas para infectar as células THP-1 foram capazes de estimular esta linhagem, não sendo evidenciada diferenças no perfil de ativação induzido pela amostra vacinal de BCG, o protótipo vacinal BCG/*sm14* e a construção BCG/pAU5. Como a ativação dos monócitos/macrófagos não é específica, não podemos determinar o “quanto” a proteína Sm14 foi responsável pela diferenciação celular. Experimentos futuros devem ser desenhados para determinar neste sistema a capacidade de ativação da proteína Sm14.

Além da avaliação da proliferação de células THP-1, autores como Medeiros (2001), Varaldo e colaboradores (2004) e Argondizzo (2005), assinalaram a necessidade de avaliarmos a capacidade de infecção e a manutenção do

crescimento intracelular de protótipos vacinais baseados na tecnologia do BCG recombinante em culturas de monócito/macrófago. Com esse objetivo, montamos um experimento para acompanhar a cinética de crescimento do BCG/*sm14*, em paralelo com os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5) empregados na infecção e na recuperação em células THP-1, nos tempos de 4, 24 e 48 horas. Nossos dados assemelham-se com os descritos na literatura (Medeiros 2001, Varaldo *et al.* 2004, Argondizzo 2005), não detectando diferenças significativas na capacidade de infecção e de crescimento intracelular entre as amostras de BCG testadas, sendo visualizada uma pequena redução do número de UFC recuperadas entre o período basal de 4 horas e após 24 e 48 horas. Podemos concluir que nas condições estudadas o protótipo vacinal BCG/*sm14* possui a mesma aptidão de infecção e persistência intracelular da amostra vacinal BCG Pasteur e da construção BCG/pAU5, favorecendo seu uso como protótipo vacinal.

Devido à problemática da estabilidade de plasmídeos recombinantes, a qual interfere fundamentalmente com a expressão da proteína heteróloga por vacinas recombinantes baseadas em vetores vivos atenuados e, evidentemente, na plataforma do BCG recombinante (Haeseleer 1994), realizou-se a avaliação da estabilidade funcional do BCG transformado com o plasmídeo pAU5-*sm14* (BCG/*sm14*). A capacidade dos BCGs recombinantes (BCG/*sm14* e BCG/pAU5) de manterem o fenótipo de resistência para canamicina (Kan), mostra que não há diferença expressiva entre os BCGs recombinantes cultivados nos meios seletivo (7H11+Kan) e não seletivo (7H11). Esses resultados confirmam os dados obtidos no trabalho realizado por Argondizzo (2005) e são extremamente importantes para o desenvolvimento de vacinas baseada na utilização do BCG como vetor vivo atenuado de imunógenos, porque demonstram que BCGs recombinantes permanecem estáveis e expressando continuamente o gene inserido mesmo no ambiente intracelular de macrófagos (Medeiros 2001, Argondizzo 2005).

Recentemente Chabalgoity e colaboradores (2007) descrevem a importância da indução de citocinas para o desenvolvimento de uma resposta protetora para o desenho de vacinas. Visando obter dados preliminares que permitam demonstrar a viabilidade da seleção *in vitro* de vacinas, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar a possibilidade de se determinar o perfil de citocinas induzidas por protótipos vacinais em linhagem de células humanas.

As citocinas são consistentemente avaliadas e quantificadas durante testes pré-clínicos e clínicos, como marcadores de ativação e/ou supressão da resposta

imune induzida pelos protótipos vacinais. Nessa conjuntura, foi realizada a análise das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α expressas pela infecção com protótipo vacinal BCG/*sm14*, com a amostra vacinal de BCG Pasteur e com a construção BCG/pAU5 em células THP-1. Para a detecção intracelular de citocinas em células, utilizamos a técnica de imunocitoquímica (Santiago 2003) e a técnica de citometria (Kallás 1999).

A produção de citocinas induzidas pelo BCG em células mononucleares periféricas humanas segue uma cinética (Sander *et al.* 1995) que varia de indivíduo para indivíduo e tende a ser mediada por um perfil Th1 nos primeiros 5 a 7 dias, regredindo e assumindo perfil Th2 posteriormente (9 a 12 dias após a infecção). Contudo, estes autores não diferenciaram a produção de IL-10 pelos monócitos/macrófagos e linfócitos T. Mas a detecção de IL-10 foi identificada somente após 10 dias de infecção, o que contradiz nossos resultados e os de Atkinson e colaboradores (2000). Uma possível explicação pode estar na metodologia utilizada, na utilização de células não estimuladas e na obtenção destas células de indivíduos não expostos a micobactérias ou não vacinados pelo BCG. Sander e colaboradores (1995) utilizaram a técnica de imunofluorescência indireta e observação microscópica, enquanto Atkinson e colaboradores (2000) utilizaram macrófagos derivados de monócitos humanos. Em nosso sistema, a secreção de IL-10 é evidenciada em células THP-1 sem prévia ativação após 4 horas de incubação, da mesma forma após 24 horas observamos resultados similares aos descritos por Atkinson e colaboradores (2000) em macrófagos derivados de monócitos (*Monocyte-derived macrophage* – MDM). De modo interessante estes autores evidenciaram uma grande variabilidade na secreção de citocinas por MDM humanos, neste caso variando de 1,0 a 7,0% de células positivas para IL-10 após 20 horas de infecção. Observamos uma diferença entre nossos resultados obtidos pelas duas técnicas (imunocitoquímica e citometria), variando de 6,4% a 11,4%, respectivamente.

Quanto a secreção de IL-12 evidenciamos que as células THP-1 produzem, mesmo sem estímulos valores entre 2,7% e 8,8%, contudo Ciabattini e colaboradores (2006) descrevem a expressão de níveis basais de IL-12 em células mononucleares humanas (Ciabattini *et al.* 2006; 1 a 3%). O perfil de expressão de IL-12 expresso pelas células THP-1 não pode ser claramente identificado pela discrepância entre as duas metodologias utilizadas por nós, ou seja, a técnica de imunocitoquímica mostrou que 8,8% das células expressavam IL-12, enquanto que por citometria identificamos 2,7% de células positivas. Contudo após infecção pelo BCG foi observado um percentual que variou de 4,6% a 6,5% após 24 horas e 6,1 a

12,0% após 48 horas, indicando um aumento progressivo de células produtoras de IL-12. A infecção pelo BCG/sm14 também foi capaz de induzir percentuais semelhantes de células produtoras de IL-12.

Independente da metodologia utilizada, as infecções por BCG e BCG/sm14 induziram um percentual ligeiramente maior de células expressando IL-10 do que IL-12. Este perfil parece ser característico das células THP-1, e a infecção com BCG/sm14 não foi capaz de modificar esse perfil.

Uma análise mais longa, estudando a associação entre o BCG e as células THP-1 pode responder se a indução tardia destas citocinas pode ser modificada, visto não termos evidenciado esta mudança em culturas de até dois dias de interação.

Uma das maiores dificuldades para o desenvolvimento de uma vacina contra esquistossomose está a complexidade da interação entre patógeno e hospedeiro. As cercárias, os vermes adultos e os diferentes estágios de desenvolvimento entre estas formas apresentam mecanismos que permitem a estes evadir de uma resposta imune efetiva, incluindo a produção de moléculas antiinflamatórias, a inibição da migração de células apresentadoras de antígeno e a cobertura da superfície do parasito com moléculas do hospedeiro (Lebens *et al.* 2004). Outro ponto importante é o pouco entendimento da natureza da resposta imune protetora (Wynn & Hoffmann 2000, Pearce & McDonald 2002, Lebens *et al.* 2004).

Alguns autores demonstraram que em modelo murino e humano, a resposta Th2 seria eficaz para o controle da doença, ao passo que estudos de vacinação em camundongos indicam que uma imunidade mediada por células T, envolvendo a produção de IFN- γ e IL-12 (Th1), poderia ser melhor (Capron *et al.* 1995, Wynn & Hoffmann 2000). No entanto, a questão da resposta imune efetiva contra esquistossomose ainda é bastante polêmica. Existem autores que acreditam ser a resposta imune humoral a mais eficaz para a proteção de humanos e outros defendem a resposta imune celular, mas existem, também, aqueles que acreditam que ambas as respostas humoral e celular são imprescindíveis para a proteção (Brito *et al.* 2000, Ribeiro de Jesus *et al.* 2000, Varaldo *et al.* 2004). Estudos imunológicos em pessoas residentes em zonas endêmicas para esquistossomose, demonstraram altos níveis de IgE e IFN- γ , sugerindo a participação das respostas celular e humoral nos mecanismos imunológicos de resistência natural a reinfeção de *S. mansoni* (Ribeiro de Jesus *et al.* 2000). O estudo realizado por Brito e colaboradores (2000) na avaliação das respostas imunes frente à proteína Sm14 em

grupos de pessoas residentes em zonas endêmicas de esquistossomose e de pacientes crônicos e tratados para a doença, em relação à avaliação das citocinas produzidas, os níveis de IL-5 e IL-10, conhecidas como citocinas Th2, não foram estatisticamente diferentes em nenhum dos grupos estudados. Já o IFN- γ e TNF- α foram produzidos em quantidades significativamente maiores pelas PBMC de indivíduos normais endêmicos. Adicionalmente demonstraram que a IL-10 é uma importante citocina moduladora de respostas de células T na esquistossomose crônica, enquanto que a proliferação de linfócitos no grupo resistente não infectado é dependente de IFN- γ . Estes resultados sugerem que a resposta imune do tipo Th1 induzida em indivíduos normais endêmicos para um antígeno de esquistossomo poderia estar associada com resistência à infecção e também destacou a importância da Sm14 como potencial candidato vacinal contra esquistossomose humana (Brito *et al.* 2000).

Uma possível justificativa para nossos resultados seria o fato da proteína Sm14 ser expressa no citoplasma do BCG aliado a persistência intracelular BCG/*sm14* em células THP-1, não estando assim, disponível para a estimulação dos macrófagos. Nesse caso a apresentação do antígeno de interesse (Sm14) só acontece quando a Sm14 é liberada do fagossomo após a destruição do BCG (Kaufmann & Hess 1999). Dados obtidos por Varaldo e colaboradores (2004) e Argondizzo (2005), demonstram que não foram detectados anticorpos anti-Sm14 em camundongos imunizados com cepas recombinantes de BCG/*sm14*. Todavia vários autores já demonstraram, não somente a expressão de diversos antígenos no citoplasma de BCG recombinantes, como também conseguiram induzir uma eficiente resposta imune humoral, independente do sistema de apresentação no qual o antígeno alvo estava sendo expresso (Aldovini & Young 1991, Murray *et al.* 1992, Stover *et al.* 1991, Kremer *et al.* 1998, Hayward *et al.* 1999; da Cruz *et al.* 2002).

Os resultados obtidos não foram capazes de diferenciar o protótipo vacinal BCG/*sm14*, da amostra vacinal BCG Pasteur e da construção BCG/pAU5, não servindo, portanto, como comparativo aos trabalhos descritos para a determinação do perfil de citocinas obtidas nas respostas imunes contra o BCG e contra a proteína Sm14.

6. CONCLUSÕES

- Desenvolveu-se um protocolo de infecção com BCGs em células THP-1, determinando que a melhor relação foi de 10 BCGs para cada célula THP-1.
- A expressão da proteína recombinante Sm14 sintetizada pelos clones de BCG/*sm14* demonstrou-se satisfatória para realização dos experimentos de infecção em células THP-1
- O protótipo vacinal BCG/*sm14* manteve o mesmo grau de infecciosidade e persistência intracelular da sub-cepa vacinal BCG Pasteur.
- O protótipo vacinal BCG/*sm14* manteve a mesma capacidade de induzir a diferenciação e a maturação de macrófagos provenientes da linhagem de monócitos THP-1 que a sub-cepa vacinal BCG Pasteur.
- O protótipo vacinal BCG/*sm14* não foi capaz de modificar o perfil de IL-10, IL-12 e TNF- α induzido pela sub-cepa vacinal BCG Pasteur em células THP-1

7. PERSPECTIVAS

- Como a indução da resposta imune ao *Schistosoma mansoni* é preferencialmente induzida por resposta Th2 (aumento de IL-10 e diminuição de IL-12, IFN- γ e IL-2), a utilização do recombinante BCG/*sm14* como protótipo vacinal pode ser de relevância para a indução de resposta protetora para a esquistossomose, como para a tuberculose, visto que não houve diferença marcante na produção de IL-10 e/ou IL-12.
- Novos experimentos devem ser realizados para determinar o papel das células apresentadoras de antígenos na modulação de células T CD4 e CD8 visando um melhor entendimento da resposta imune adaptativa e de memória.
- A modulação das células apresentadoras de antígenos (monócitos, macrófagos, células dendríticas) pode direcionar a resposta imune a protótipos vacinais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK & Lichtman AH. **Imunologia celular e molecular**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005a. Cap.11: Citocinas. p. 251–282.

_____. **Imunologia celular e molecular**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005b. Cap.12: Imunidade inata. p. 283–306.

Ada G. The immunology of vaccination. In: Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines**. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2004. p. 31–46

_____. **Vaccines and vaccination**. N Engl J Med. 2001; 345 (14): 1042–1053

Al-Sherbiny M, Osman A, Barakat R, El Morshedy H, Bergquist R, Olds R. **In vitro cellular and humoral responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens**. Acta Trop. 2003; 88 (2): 117-130.

Aldovini A & Young RA. **Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-mv vaccines**. Nature. 1991; 351: 479–482

Amadori M, Ritelli M, Tagliabue S, Pacciarini ML. **Macrophage cell cultures for rapid isolation of intracellular bacteria: the *Mycobacterium bovis* model**. Methods Mol Biol. 2006; 345: 203–217

André FE. **Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises**. Vaccine 2003; 21: 593–595.

Argondizzo APC. **Construção do *M. bovis* BGC recombinante Sm14r e Avaliação da sua Capacidade Protetora contra Esquistossomose no Modelo Murino**. Rio de Janeiro; 2005. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] – FIOCRUZ

ATCC – *American type culture collection* **THP-1 Catalog Details: TIB-202** [online]. Manassas, EUA. 2006. [capturado em 10 de setembro de 2006]. Disponível em: <http://www.atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=TIB-202>

Atkinson S, Valadas E, Smith SM, Lukey PT, Dockrell HM. **Monocyte-derived macrophage cytokine responses induced by *M. bovis* BCG**. Tuber Lung Dis. 2000; 80 (4-5):197-207. Erratum in: Tuber Lung Dis 2000; 80 (6): 293.

Auwerx J. **The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation**. Experimentia. 1991; 47: 22–31.

Balls M. **Future Improvements: replacement *in vitro* methods**. ILAR J. 2002; 43 (Suppl): S69–S73

Bastos K.RB, Alvarez JM, Marinho CRF, Rizzo LV, D'Império Lima MR. **Macrophages from IL-12p40-deficient mice have a bias toward the M2 activation profile**. J. Leukoc. Biol. 2002; 71: 271–278

Bennett S, Por SB, Cooley MA, Breit SN. ***In vitro* replication dynamics of human culture-derived macrophages in a long term serum-free system**. J Immunol. 1993; 150 (6): 2364–2371

Berges C, Naujokat C, Tinapp S, Wieczorek H, Hoh A, Sadeghi M, Opelz G, Daniel V. **A cell line model for the differentiation of human dendritic cells.** Biochem Biophys Res Commun. 2005; 333 (3): 896–907

Beverley PCL. **Immunology of vaccination.** Br Med Bull. 2002; 62: 15-28

Bonah C. **The 'experimental stable' of the BCG vaccine: safety, efficacy, proof, and standards, 1921-1933.** Stud Hist Philos Biol Biomed Sci. 2005; 36(4): 696–721

Brito CF, Caldas IR, Coura Filho P, Correa-Oliveira R, Oliveira SC. **CD4+ T cells of schistosomiasis naturally resistant individuals living in an endemic area produce interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha in response to the recombinant 14KDA *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein.** Scand J Immunol. 2000; 51 (6): 595–601

Brusic V, August JT & Petrovsky N. **Information technologies for vaccine research.** Expert Rev Vaccines. 2005; 4 (3): 407–417

Campbell D, Mann BJ & Chadee K. **A subunit vaccine candidate region of the *Entamoeba histolytica* galactose-adherence lectin promotes interleukin-12 gene transcription and protein production in human macrophages.** Eur J Immunol. 2000; 30 (2): 423-30.

Capron A, Riveau G, Grzych JM, Boulanger D, Capron M, Pierce R. **Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomes: background and update.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 1995; 90 (2): 235–240

Carrel A. **On the permanent life of tissues outside the organism.** J. Exp. Med. 1912, 15: 516 – 528 *apud* Freshney RI. Introduction to basic principles. In: Masters JRW. **Animal cell culture: a practical approach.** 3rd ed. Oxford: Oxford University Press. 2000b: 1-18.

Chabalgoity JA, Baz A, Rial A, Grille S. **The relevance of cytokines for development of protective immunity and rational design of vaccines.** Cytokine Growth Factor Rev. 2007; 18 (1-2): 195–207

Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. **The global status of schistosomiasis and its control.** Acta Trop. 2000; 77 (1): 41–51

Ciabattini A, Cuppone AM, Pulimeno R, Iannelli F, Pozzi G, Medaglini D. **Stimulation of human monocytes with the gram-positive vaccine vector *Streptococcus gordonii*.** Clin Vaccine Immunol. 2006; 13 (9): 1037-43.

Clingan JM, Yanagawa Y, Iwabuchi K, Onoé K. **Effect of T helper 1 (Th1) / Th2 cytokine on chemokine-induced dendritic cell functions.** Cell Immunol. 2006; 242: 72–79.

Costa-Carvalho BT & Sole D. Bases Imunológicas. In: Farhat CK, Carvalho ES, Weckx LY, Carvalho LHFR, Succi RCM, org. **Imunizações: fundamentos e prática** 4^a ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2000. p. 19–36.

da Cruz FW, McBride AJA, Conceição FR, Dale JW, McFadden J, Dellagostin OA. **Expression of the B-cell and T-cell epitopes of the rabies virus nucleoprotein in *Mycobacterium bovis* BCG and induction of an humoral response in mice.** Vaccine. 2002; 20: 731–736

Dai W, Gao H, Huang H, Yuan Y, Hu J, Huangfu Y. **Comparative study on the immunogenicity between recombinant MS-Sj26GST vaccine and recombinant BCG-Sj26GST vaccine in *Schistosoma japonicum*.** J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2003, 23 (3): 213–5

Dellepiane N, Griffiths E & Milstien JB. **New challenges in assuring vaccine quality.** Bull World Health Organ. 2000; 78 (2): 155–62

Di Marzo P, Puddu P, Conti L, Belardelli F, Gesani S. **Interferon- γ up-regulates its own gene expression in mouse peritoneal macrophages.** J Exp Med. 1994; 179: 1731-1736.

Diaz-Silvestre H, Espinosa-Cueto P, Sanchez-Gonzalez A, Esparza-Ceron MA, Pereira-Suarez AL, Bernal-Fernandez G, Espitia C, Mancilla R. **The 19-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a major adhesin that binds the mannose receptor of THP-1 monocytic cells and promotes phagocytosis of mycobacteria.** Microb Pathog. 2005; 39 (3): 97–107

Doyle A & Griffiths JB. **Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology.** West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 1998. Cap.1 The cell: Selection and standardization. p. 3–52

Ellis RW. Technologies for making new vaccines. **In:** Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines.** 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2004. p. 1177–1198

Esser MT, Marchese RD, Kierstead LS, Tussey LG, Wang F, Chirmule N, Washabaugh MW. **Memory T cells and vaccines.** Vaccine. 2003, 21 (5-6): 419–430

Fantuzzi L, Puddu P, Varano B, Del Corno M, Belardelli F, Gessani S. **IFN-alpha and IL-18 exert opposite regulatory effects on the IL-12 receptor expression and IL-12-induced IFN-gamma production in mouse macrophages: novel pathways in the regulation of the inflammatory response of macrophages.** J Leukoc Biol. 2000; 68: 707-714.

FDA – *Food and drug administration.*. **Guidance for industry: Characterization and qualification of cell substrates and other biological starting materials used in the production of viral vaccines for the prevention and treatment of infectious disease.** [online]. Rockville: 2006. [capturado em 10 de janeiro de 2007]. Disponível em: <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>.

Fernandes ATG. **Identificação de células citotóxicas presentes no processo inflamatório uterino durante a co-infecção pelo vírus da imunodeficiência humana HIV e pelo vírus do papiloma humano HPV.** Rio de Janeiro. 2003. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] Fiocruz.

Freshney RI. Introduction to basic principles. In: Masters JRW, org. **Animal cell culture: a practical approach**. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press. 2000a. p. 1–18

_____. **Culture of animal cells: a manual of basic techniques**. 4th ed. New York: Wiley-Liss Inc. 2000b. Cap.1: Introduction. p. 1–8

Guermontprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. **Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells**. Annu Rev Immunol. 2002; 20: 621-67.

Haeseleer F. **Structural instability of recombinant plasmids in mycobacteria**. Res Microbiol. 1994; 145: 683–687

Harrison RG. **Observations on the living developing nerve fiber**. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1910, 140: 1905 – 7 *apud* Freshney RI. Introduction to basic principles. In: Masters JRW, org. **Animal cell culture: a practical approach**. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press. 2000b. p. 1-18.

Hasan Z, Ashraf M, Tayyebi A, Hussain R. **M. leprae inhibits apoptosis in THP-1 cells by downregulation of Bad and Bak and upregulation of Mcl-1 gene expression**. BMC Microbiol. 2006; 6: 1-9.

Hayward CMM, O'Gaora P, Young DB, Griffin GE, Thole J, Hirst TR, Castello-Branco LR, Lewis DJM. **Construction and murine immunogenicity of recombinant Bacille Calmette Guérin vaccines expressing the B subunit of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin**. Vaccine. 1999, 17: 1272–1281.

Hendriksen CFM. **Laboratory animals and immunization procedures: challenges and opportunities**. ILIAR J. 2005; 46 (3): 227–229.

Henriques MGMO & Sampaio ALF. Alternativas para animais de laboratório: sistemas *in vitro*. In: Andrade A, Pinto SC & Oliveira RS, org. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002: 337–344

Kallás EG. **Detecção da produção antígeno-específica de IFN γ e IL-4 por linfócitos T de sangue periférico após infecção e vacinação**. São Paulo 1999. Doutorado [Escola Paulista de Medicina] Universidade Federal de São Paulo

Kaufmann SHE & Flynn JL. CD8 T cells in tuberculosis. In: Cole ST, Eisenach D, McMurray DN, Jacobs Jr WR, org. **Tuberculosis and the tubercle bacillus**. Washington: ASM Press. 2005. p. 155–164.

Kaufmann SH & Hess J. **Impact of intracellular location of and antigen display by intracellular bacteria: implications for vaccine development**. Immunol Lett. 1999; 65 (1-2): 81–4

Kidd P. **Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease**. Altern Med Rev. 2003; 8 (3): 223-246.

Kremer L, Dupre L, Riveau G, Capron A, Loch C. **Systemic and mucosal immune responses after intranasal administration of recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin expressing glutathione S-transferase from *Schistosoma haematobium*.** Infect Immun. 1998; 66 (12): 5669-5676.

Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, Graeber TG, Sieling PA, Liu YJ, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. **TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells.** Nat Med. 2005, 11 (6): 653–660

Laemmli UK. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature. 1970, 227: 680-685

Larsen NG. **Drug and Device Development Guide.** Copenhagen: Medicon Valley Academy. 2005. Cap. 1: Development – definition, costs and time. p. 9-13

Lebens M, Su J, Czerkinsky C, Holmgren J. **Current status and future prospects for a vaccine against schistosomiasis.** Expert Rev Vaccines. 2004; 3 (3): 315-328.

Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, Sherman DR. **Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation.** J Infect Dis. 2003; 187 (1): 117–123

MacCullough KC & Summerfield A. **Basic concepts of immune response and defense development.** ILAR J. 2005; 46 (3): 230–240.

Mantovani A, Sica A & Locati M. **Macrophage polarization comes of age.** Immunity. 2005; 23 (4): 344 – 346

MacFarland J. **Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines.** J Am Med Assoc. 1907; 14: 1176-1178

Medeiros MA. **Desenvolvimento do *Mycobacterium bovis* BCG como sistema de expressão de antígeno vacinal de *Bordetella pertussis*.** Pelotas; 2001. Doutorado – Universidade Federal de Pelotas.

Medeiros MA, Armoa GR, Dellagostin AO, McIntosh D. **Induction of humoral immunity in response to immunization with recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the S1 subunit of *Bordetella pertussis* toxin.** Can. J. Microbiol. 2005; 51 (12): 1015 - 20.

Metz B, Hendriksen CFM, Jiskoot W, Kersten GFA. **Reduction of animal use in vaccine quality control: opportunities and problems.** Vaccine. 2002, 20: 2411 – 2430

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Annette MH. **M1/M2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm.** J Immunol. 2000; 164: 6166-6173.

Misumi S, Endo M, Mukai R, Tachibana K, Umeda M, Honda T, Takamune N, Shoji S. **A novel cyclic peptide immunization strategy for preventing HIV-1/AIDS infection and progression.** J Biol Chem. 2003; 278 (34): 32335-43.

- Mosmann TR. **Cytokines: is there biological meaning?** Curr. Opin Immunol. 1991, 3: 311-314
- Mosmann TR & Coffman RL. **Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells.** Adv. Immunol. 1989, 46: 111-147
- Murray A, Winter N, Lagranderie M, Hill DF, Rauzier J, Timm J, Leclerc C, Moriaty KM, Gheorghiu M, Gicquel B. **Expression of *Escherichia coli* beta-galactosidase in *Mycobacterium bovis* BCG using an expression system isolated from *Mycobacterium paratuberculosis* which induced humoral and cellular immune responses.** Mol Microbiol. 1992, 6 (22): 3331-3342.
- NIAID - *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*. **Understand vaccines: What they are / How they work.** Washington: NIH publication, 2003. 55 pp.
- Ohara N & Yamada T. **Recombinant BCG vaccines.** Vaccine. 2001, 19: 4089–4098
- Oliveira MM, Charlab R, Pessolani MC. ***Mycobacterium bovis* BCG but not *Mycobacterium leprae* induces TNF-alpha secretion in human monocytic THP-1 cells.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96 (7): 973-978.
- Parlow TG. A resposta imunológica. In: Parlow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB, org. **Imunologia médica.** 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004. p. 52-60.
- Pearce EJ & McDonald AS. **The immunobiology of schistosomiasis.** Nat Rev Immunol. 2002; 2 (7):499-511.
- Plotkin SA. **Six revolutions in vaccinology.** Pediatr Infect Dis J. 2005a, 24 (1): 1–9
- _____. **Vaccines: past, present and future.** Nat Med. 2005b, 11 (4 Suppl): S5-S11.
- Plotkin SL & Plotkin SA. A short history of vaccination. In: Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines.** 4th ed. Philadelphia: Saunders, 2004: 1-12
- Presgrave OAF. **Teste de liberação de citocinas como método alternativo ao ensaio de pirogênio em coelhos no controle da qualidade de produtos injetáveis.** Rio de Janeiro; 2003. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] - Fundação Oswaldo Cruz
- Presgrave OAF. Alternativas para animais de laboratório: do animal ao computador. In: Andrade A, Pinto SC & Oliveira RS, org. **Animais de laboratório: criação e experimentação.** Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002. p. 361–368
- Rappuoli R. **From Pasteur to genomics: progress and challenges in infectious diseases.** Nat Med. 2004, 10 (11): 1177–1185
- Reis e Sousa C. **Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity.** Curr Opin Immunol. 2004a, 16 (1): 21–5

_____. **Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls.** *Semin Immunol.* 2004b, 16 (1): 27–34

Rezende CA, De Moraes MT, de Souza Matos DC, McIntoch D, Armoa GR. **Humoral response and genetic stability of recombinant BCG expressing hepatitis B surface antigens.** *J Virol Methods* 2005; 125 (1): 1–9.

Ribeiro de Jesus A, Araújo I, Bacellar O, Magalhães A, Pearce E, Harn D, Strand M, Carvalho EM. **Human immune responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens.** *Infect Immun.* 2000; 68 (5): 2797–803

Ritelli M, Amadori M, Tagliabue S, Pacciarini ML. **Use of a macrophage cell line for rapid detection of *Mycobacterium bovis* in diagnostic samples.** *Vet Microbiol.* 2003; 94: 105-120.

Rosenthal KS & Zimmerman DH. **Vaccines: All things considered.** *Clin Vaccine Immunol.* 2006; 13 (8): 821-829

Russell WMS. & Burch RL. **The Principles of Humane Experimental Technique.** London: Methuen. Smyth, D. 1959. 238 pp.

Saalmüller A. **New understanding of immunological mechanisms.** *Vet Microbiol.* 2006; 117 (1): 32-8.

Sander B. Skansén-Saphir, Damm O, Hakansson L, Andersson J, Andersson U. **Sequential production of Th1 and Th2 cytokines in response to live bacillus Calmette-Guerin.** *Immunology.* 1995, 86 (4): 512–8

Santiago ACC. **Correlação entre a colonização pelos isolados clínicos de *Mycobacterium avium* e a imunidade celular específica a antígenos micobacterianos em pacientes HIV-1 positivos.** Rio de Janeiro 2003. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] FIOCRUZ.

Santos JPS. **Avaliação da estabilidade estrutural e funcional de vetores plasmidiais recombinantes bifuncionais (*Escherichia coli* – *Mycobacterium*) em *Mycobacterium bovis* BCG.** Rio de Janeiro; 2002. Mestrado [Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes] – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Serruto D & Rappuoli R. **Post-genomic vaccine development.** *FEBS Lett.* 2006, 580: 2985–2992.

SLIPE – Sociedade Latinoamericana de Infectologia Pediátrica & API – Associação Panamericana de Infectologia. **Manual de Vacinas da América Latina.** Madrid: Euro RSCG Life Esquema, 2005. 620 pp.

Smith KC & Starke JR. Bacille Calmette-Guérin vaccine. **In:** Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines.** 4ª ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2004 p. 179–210

Smith SG, Patel PM, Selby PJ, Jackson AM. **The response of human dendritic cells to recombinant adenovirus, recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus**

Calmette Guerin and biolistic methods of antigen delivery: different induction of contact-dependant and soluble signals. Immunol Lett. 2001; 76 (2): 79-88.

Standiford TJ. **Anti-inflammatory cytokines and cytokine antagonists.** Curr Pharm Des. 2000, 6 (6): 633-49.

Stokes RW & Doxsee D. **The receptor-mediated uptake, survival, replication, and drug sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* within the Macrophage-like cell line THP-1: A comparison with human monocyte-derived macrophages.** Cell Immunol. 1999; 197: 1-9

Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, Bennett LT, Bansal GP, Young JF, Lee MH, Hatfull GF, Snapper SR, Barletta RG, Jacobs WR, Bloom RR. **New use of BCG for recombinant vaccines.** Nature. 1991, 351: 456-460.

Takahashi H. **Antigen presentation in vaccine development.** Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2003, 26 (5-6): 309–28

Tendler M, Brito CA, Vilar MM, Serra-Freire N, Diogo CM, Almeida MS, Delbem ACB, Silva JF, Savino W, Garrat RC, Katz N, Simpson AJG. **A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine.** Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93: 269–273

Theus SA, Cave MD & Eisenach KD. **Activated THP-1 cells: an attractive model for the assessment of intracellular growth rates of *Mycobacterium tuberculosis* isolates.** Infect Immun. 2004; 72(2): 1169-1173

_____. **Intracellular macrophage growth rates and cytokine profiles of *Mycobacterium tuberculosis* strains with different transmission dynamics.** Infect Dis. 2005; 191 (3): 453–60

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. **Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1).** Int. J. Cancer. 1980; 26: 171-176

Varaldo PB, Leite LCC, Dias WO, Miyaji EN, Torres FIG, Gebara VC, Armôa GRG, Campos AS, Matos DCS, Winter N, Gicquel B, Vilar MM, McFadden J, Almeida MS, Tendler M, McIntosh D. **Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* protects mice from cercarial challenge.** Infect Immun. 2004; 72(6): 3336-3343

Varaldo PB, Miyaji EN, Vilar MM, Campos AS, Dias WO, Armôa GRG, Tendler M, Leite LCC, McIntosh D. **Mycobacterial codon optimization of the gene encoding the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* in recombinant *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin enhances protein expression but not protection against cercarial challenge in mice.** FEMS Immunol Med Microbiol. 2006, 48 (1): 132-139.

Wack A & Rappuoli R. **Vaccinology at the beginning of the 21st century.** Curr Opin Immunol. 2005, 17 (4): 411– 418

WHO. *World health organization*. **TDR Progress: New and Improved Tools - New candidates in development: vaccine development schistosomiasis**. Geneva: 2000. [capturado em 16 de outubro de 2004]. Disponível em: <http://who.int/tdr/research/progress9900/tools/vaccine-schistossomiasis.htm>.

_____. **Global Plan to stop tuberculosis 2006-2015**. Geneva: WHO Press. 2006: 1-17

Wynn TA & Hoffmann KF. **Defining a schistosomiasis vaccination strategy – it is really Th1 versus Th2?** *Parasitol Today*. 2000; 16, (11): 497–501.

Xia HH, Lam SK, Chan AO, Lin MC, Kung HF, Ogura K, Berg DE, Wong BC. **Macrophage migration inhibitory factor stimulated by *Helicobacter pylori* increases proliferation of gastric epithelial cells**. *World J Gastroenterol*. 2005, 11 (13): 1946–1950

Xing Z, Zganiacz A & Santosuosso M. **Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF-alpha and nitric oxide from macrophages via IFN-gamma induction**. *J Leukoc Biol*. 2000; 68: 897-902.

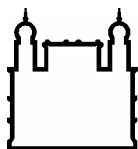
Zhao G, Etherton TD, Martin KR, Vanden Heuvel JP, Gillies PJ, West SG, Kris-Etherton PM. **Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells**. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 336 (3): 909–917.

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE AVALIAÇÃO DE
PROTÓTIPOS VACINAIS EM LINHAGEM DE MONÓCITO HUMANA
(THP-1)**

DANILO PARMERA

RIO DE JANEIRO
2007



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

DANILO PARMERA

**Desenvolvimento de um modelo de avaliação de protótipos
vacinais em linhagem de monócito humana (THP-1)**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos

RIO DE JANEIRO

2007

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas / ICICT / FIOCRUZ - RJ

P253 Parmera, Danilo

Desenvolvimento de um modelo de avaliação de protótipos vacinais em
linhagem de monócito humana (THP-1) / Danilo Parmera. – Rio de Janeiro,
2007.

xiii, 64 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos,
Tecnologia em Imunobiológicos, 2007.

Bibliografia: f. 56-64.

1. THP-1. 2. Vacina BCG. 3. Sm-14. 4. Vacina – Protótipo. 5. Citocinas.
I. Título.

CDD: 615.372

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico, Laboratório de Tecnologia Recombinate e no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Departamento de Micro-Imuno e Parasitologia, Serviço de Imunologia, Laboratório de Imunologia Celular, sob a orientação do Prof. Dr. Geraldo Rodrigues Garcia Armoa e Prof Dra. Maria da Glória Bonecini de Almeida.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

DANILO PARMERA

**Desenvolvimento de um modelo de avaliação de protótipos
vacinais em linhagem de monócito humana (THP-1)**

ORIENTADORES: Prof. Dr. Geraldo Rodrigues Garcia Armôa
Prof^a. Dr^a. Maria da Glória Bonecini de Almeida

Examinadores:

Prof. Dr. Douglas McIntosh – Bio-Manguinhos – Presidente

Prof^a. Dr^a. Cynthia Silveira Horn – IPEC/FIOCRUZ

Prof. Dr. Walter Martin Roland Oelemann – IMPPG/UFRJ

Rio de Janeiro

Dedico esta Dissertação a Deus,

pelo dom da vida.

a minha família

pelo carinho e apoio na minha trajetória,

à minha noiva, Fernanda,

pelo amor.

AGRADECIMENTOS

À FIOCRUZ, em nome de seu presidente Dr. Paulo Marchiori Buss, por proporcionar a excelência na produção de fármacos e imunobiológicos e no desenvolvimento científico de nosso país.

À Bio-Manguinhos, em nome do seu diretor Dr. Akira Homma, pela oportunidade e condições propiciadas à realização de uma pós-graduação profissional.

Ao IPEC, em nome da sua diretora Dra. Valdiléa Gonçalves Veloso, pelas condições propiciadas à realização da minha dissertação.

Ao orientador e amigo Prof. Dr. Geraldo Rodrigues Garcia Armôa por acreditar no meu potencial, pelos valorosos ensinamentos, apoio incondicional e incentivo aos trabalhos realizados.

À orientadora e amiga Prof^a. Dr^a. Maria da Glória Bonecini de Almeida pelas portas abertas de seu laboratório, possibilitando a execução deste trabalho e pela sincera atenção com que sempre me recebeu e pelo exemplo de pesquisadora.

Aos Professores, Coordenadora e Secretária do MPTI, que muito contribuíram na minha valorização humana e aos meios acadêmicos para ingresso, manutenção e término do curso.

À Dr^a. Cynthia Silveira Horn, pelas importantes contribuições durante a realização deste trabalho, em especial o experimento de proliferação celular.

Ao Dr. Douglas MacIntosh, pelas importantes contribuições durante a realização deste trabalho, em especial no auxílio na realização dos ensaios de *western blotting*, no cultivo das amostras de BCG e na revisão deste manuscrito.

Aos amigos Ana Paula Argondizzo, João Pedro Souza Santos, Gabriela dos Santos Esteves, Dilzamar Velloso do Nascimento, Dr. José Procópio Senna, Dr. Marco Antônio Medeiros, Natália Plínio dos Santos, Dra. Elezer Monte Blanco Lemes, Camilla Bayma, Dra. Ana Carolina Góes pelo companheirismo, amizade, solidariedade e apoio pessoal e profissional.

À amiga Maria Luiza Azevedo pela amizade, eficiência, disponibilidade de auxílio em todos os momentos e palavras reconfortantes nos momentos de desespero.

À doutoranda e amiga Ana Teresa Fernandes pela alegria e disposição no auxílio dos experimentos de imunocitoquímica

Aos tecnologistas e amigos Andréia Lamoglia e Márcio Mantuano pelo auxílio na realização dos experimentos realizados no citômetro de fluxo.

À amiga Larissa Catharina Costa pela colaboração e dedicação nos experimentos infinitos e pelos momentos divertidos no laboratório.

Ao amigo Dyego Carletti pelo auxílio no experimento de proliferação celular.

Aos colaboradores e amigos do Serviço de Imunologia, Dra. Liane Castro, Carla Bial, Márcia Andrade, Millena Rosalba, Ana Cristina Santiago Leandro, Marcelo Leandro, Leonardo Gatto, Silvia Silva, Regina Pimenta, Maristela Lima, Monique Lima e a equipe do laboratório de Imunodiagnóstico pelo companheirismo e apoio.

Aos companheiros do Mestrado Profissional, no qual dividimos boa parte de nossas manhãs, pela cooperação e companheirismo.

Aos parentes e amigos pelos momentos de descontração, conversas, apoio, amizade, alegrias e tristezas compartilhadas. (por serem muitos não serão citados, mas estarão sempre em minha memória)

A todas as pessoas que não foram nominalmente mencionadas, mas que contribuíram para viabilizar este trabalho.

E, finalmente, a Deus, que proporcionou a mim e a minha família os meios possíveis para alcançar a felicidade.

"ESPERE O MELHOR, PREPARE-SE PARA O PIOR E ACEITE O QUE VIER."

Provérbio Chinês

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	lx
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3. METODOLOGIA.....	15
3.1 Cultivo da célula THP-1.....	15
3.2. Cultivo das cepas de BCG.....	16
3.3 Avaliação da expressão da proteína recombinante Sm14 em BCG/ <i>sm14</i>	17
3.4 Padronização da multiplicidade de infecção (MOI) do BCG-P.....	18
3.5 Infecção com BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles em células THP-1.....	19
3.6 Avaliação da capacidade de proliferação celular da célula THP-1.....	19
3.7 Avaliação da estabilidade funcional (expressão do gene <i>kanR</i>) do vetor de expressão pAU5 dos BCGr.....	20
3.8 Protocolo de imunocitoquímica para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1.....	20
3.9 Protocolo de citometria de fluxo para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1.....	22
4. RESULTADOS.....	24
4.1 Cultivo da célula THP-1.....	24
4.1.1 Meios de cultivo.....	24
4.1.2 Manutenção.....	24
4.2. Cultivo das cepas de BCG.....	25
4.3 Expressão da proteína Sm14 pelo BCG/ <i>sm14</i>	26
4.4 Multiplicidade de infecção (MOI) BCG:THP-1	26

4.5 Capacidade de proliferação da célula THP-1 infectada pelo BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles.....	29
4.6 Avaliação da viabilidade e estabilidade funcional (expressão do gene <i>kanR</i>) do BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles recuperados de células THP-1	30
4.7. Avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles em células THP-1 por imunocitoquímica	31
4.8 Avaliação das citocinas a partir da infecção com BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles em células THP-1 por Citometria de Fluxo	34
4.9 Comparação entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo.....	39
4.9.1 Detecção de IL-10.....	39
4.9.2 Detecção de IL-12.....	41
4.9.3 Detecção de TNF- α	43
5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÕES	54
7. PERSPECTIVAS	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	grau Celsius
μCi	micro Curie
μL	Microlitro
μg	Micrograma
ADC	Albumina – Dextrose – Catalase
APC	<i>Antigen presenting cells</i> – célula apresentadora de antígenos
API	Associação Panamericana de Infectologia
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATLA	<i>Alternatives to Laboratory Animals</i>
BCG	<i>Mycobacterium bovis</i> Bacilo Calmette-Guérin
BCG-P	<i>M. bovis</i> Bacilo Calmette-Guérin sub-cepa Pasteur 1173P2
BCGr	<i>M. bovis</i> Bacilo Calmette-Guérin recombinante
BCG/pAU5	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepa Pasteur transformado o vetor de expressão pAU5
BCGr/pPL73-sm14	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepa Pasteur 1173P2 transformado com vetor de expressão pPL73 contendo o gene <i>sm14</i> de <i>S. mansoni</i>
BCG/sm14	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepa Pasteur 1173P2 transformado com o vetor de expressão pAU5 contendo o gene <i>sm14</i> de <i>S. mansoni</i>
Bio-Manguinhos	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
BP	<i>Band pass</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i> – grupo de diferenciação 4
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i> – grupo de diferenciação 8
cm ²	Centímetro quadrado
CMI	<i>Cell-mediated immunity</i> – Imunidade mediada por células
Com	Contagem por minuto
CO ₂	Gás carbônico
CpG	Dinucleotídeo formado pela ligação fosfodiéster de citosina com guanina na mesma fita de DNA
CTFA	<i>Cosmetic, Toiletries and Frangrance Association</i>

DAB	3-3' diaminobenzidina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> – Meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> – Ácido desoxirribonucleico
Dr(a).	Doutor(a)
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECVAM	<i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i>
EUA	Estados Unidos da América
FABP	<i>Fatty acid binding protein</i> - Proteína ligante a ácidos graxos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> – Isotiocianato de fluoresceína
FL	Análise de fluorescência (citometria de fluxo)
FRAME	<i>Fund for Replacement of Animal Medical Experiments</i>
FSC	<i>Foward angle light scatter</i>
g	Gramas
<i>g</i>	Aceleração gravitacional
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i> – Solução salina de Hank
HEPES	Acido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IFN	Interferon
IMPPG	Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
IRAG	<i>Interagency Regulatory Alternatives Group</i>
Kan	Canamicina
<i>KanR</i>	Gene de resistência à canamicina derivado do Tn903
kDa	Kilodaltons
LATER	Laboratório de Tecnologia Recombinante
log	Logaritmo
log ₁₀	Logaritmo na base 10
LPS	Lipopolissacarídeo

LSAB	<i>Labeled StreptAvidin Biotin</i>
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
M1	Macrófago tipo 1
M2	Macrófago tipo 2
MDM	<i>Monocyte-derived macrophage</i> – Macrófago derivado de monócito
MEM	<i>Minimum essential medium of Eagle</i> – Meio mínimo essencial de Eagle
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> - Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitro
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> – Multiplicidade de infecção
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Msc	Mestre
nº	Número
ng	Nanograma
NIAID	<i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i> - EUA
NK	<i>Natural killer cells</i> – Células matadoras naturais
nm	Nanômetro
O ₂	Gás oxigênio
OADC	Ácido oléico – Albumina – Dextrose – Catalase
<i>oriE</i>	Origem de replicação do bacteriófago T4 de <i>Escherichia coli</i>
<i>oriM</i>	Origem de replicação do plasmídeo pAL5000 de <i>Mycobacterium fortuitum</i>
PA	<i>pro analisis</i> - para análise
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> – Padrões moleculares associados ao patógeno
PAPES	Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde
pAU5	Vetor de expressão citoplasmático
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> - Células mononucleares do sangue periférico
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> - Salina tamponada de fosfato

PBS-T	<i>Phosphate-buffered saline Tween20</i> - Salina tamponada de fosfato com Tween20
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
PE	<i>Phycoerythrin</i> - Ficoeritrina
pH	Potencial hidrogenionico
<i>Phsp60*</i>	Promotor <i>hsp60</i> de <i>Mycobacterium bovis</i> BCG modificado
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
POPOP	p-bis[2(5-. feniloxazoil)]-benzeno
PPO	2,5-difeniloxazol
Prof(a)	Professor (a)
PRR	<i>Pattern-recognition receptors</i> – Receptores de reconhecimento padrão
R1	Região de análise (citometria de fluxo)
Reg	Registro
rpm	Rotação por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> – Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SFB	Soro fetal bovino
SLIPE	Sociedade Latinoamericana de Infectologia Pediátrica
Sm14	Proteína de <i>Schistosoma mansoni</i>
Sm14r	Proteína recombinante de <i>S. mansoni</i> expressa em <i>E. coli</i>
<i>sm14</i>	Gene de <i>S. mansoni</i>
SSC	<i>Side angle light scatter</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> – Salina tamponada de Tris
TBS-T	<i>Tris-buffered saline Tween 20</i> – Salina tamponada de Tris com Tween 20
Tc	<i>T cytotoxic cell</i> – Célula T citotóxica
TCR	<i>T cell receptor</i> – receptor de célula T
TDR	<i>Special programme for research and training in tropical disease</i>

TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i> - Fator transformador de crescimento beta
Th	<i>T helper cell</i>
Th1	<i>T helper cell type 1</i> – Célula T auxiliar tipo 1
Th2	<i>T helper cell type 2</i> – Célula T auxiliar tipo 2
Timidina-H ³	Timidina tritiada
TLR	<i>Toll like receptor</i> – Receptor do tipo Toll
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alfa</i> - Fator de necrose tumoral alfa
TPA	12-O-tetradecanolforbol-13-acetato
Treg	<i>T regulatory cell</i> – Célula T regulatória
UFC	Unidades formadoras de colônias por mililitro
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
v	Volume
WHO	<i>World Health Organization</i> – Organização Mundial da Saúde
x	Vezes

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Características das cepas de BCGs	16
Tabela 3.2: Anticorpos utilizados no protocolo de imunocitoquímica.....	21
Tabela 3.3: Anticorpos utilizados no protocolo de citometria de fluxo.....	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Visão esquemática da indução do sistema imune gerada por um patógeno ou uma vacina.....	08
Figura 1.2: Diagrama do modelo molecular da proteína Sm14.....	11
Figura 4.1: Microscopia óptica (200 x) de células THP-1, após três passagens, mantidas em meio RPMI 1640 preparado com 0,2% de NaHCO ₃ e suplementado com 10% de SFB.....	24
Figura 4.2: Cultura de <i>M. bovis</i> BCG Pasteur cultivado em meio 7H11 suplementado com 10% de OADC.....	25
Figura 4.3: Expressão da proteína Sm14 produzida pelos quatro clones de BCG/ <i>sm14</i> utilizados nos experimentos de infecção.....	26
Figura 4.4: Expressão de IL-10, IL-12 e TNF- α em células THP-1 infectadas com BCG-P.....	28
Figura 4.5: Atividade proliferativa das células THP-1 infectadas pelo BCG/ <i>sm14</i> e pelos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5)	29
Figura 4.6: Cinética da viabilidade do protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e dos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5) recuperados de células THP-1 e cultivados nos meios Middlebrook 7H11 7H11/Kan.....	31
Figura 4.7: Microscopia óptica (1000 x) de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após 24 horas de infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), detectadas por imunocitoquímica.....	32
Figura 4.8: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica.....	33
Figura 4.9: Determinação da região de análise das células THP-1 mantidas em cultivo celular.....	34

Figura 4.10: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 TNF- α e após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	35
Figura 4.11: Gráfico tamanho (FSC) <i>versus</i> fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	36
Figura 4.12: Gráfico tamanho (FSC) <i>versus</i> fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	37
Figura 4.13: Gráfico tamanho (FSC) <i>versus</i> fluorescência (FL1 ou FL2) da avaliação de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	38
Figura 4.14: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria de fluxo.....	40
Figura 4.15: Percentagem de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria.....	42
Figura 4.16: Percentagem de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria.....	44
Figura 5.1: Modelo esquemático das etapas necessárias para implantação de novos fármacos e imunobiológicos.....	47

RESUMO

As culturas de células vêm sendo utilizadas extensivamente no desenvolvimento e na produção de uma variedade de produtos terapêuticos e profiláticos, tornando-se uma ferramenta indispensável para geneticistas, imunologistas, vacinologistas e a indústria farmacêutica. A adoção de sistemas de ensaios celulares *in vitro* tem sido aplicada como um método alternativo para a substituição ou diminuição do uso de animais nas fases de desenvolvimento, produção e testes de vacinas, demonstrando resultados promissores. Da mesma forma, sistemas computacionais podem ampliar a utilização desta ferramenta para etapas do desenvolvimento de vacinas candidatas na fase pré-clínica. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um protocolo *in vitro* utilizando culturas de células humanas - a linhagem de monócitos THP-1, para a seleção de um protótipo vacinal - a cepa Pasteur de *Mycobacterium bovis* BCG expressando o antígeno Sm14 de *Schistosoma mansoni* (BCG/sm14). Para isso foram empregadas duas metodologias – citometria de fluxo e imunocitoquímica, para a identificação do perfil da expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α . Foram utilizados como controles a cepa Pasteur do *M. bovis* BCG e a construção da cepa Pasteur do *M. bovis* BCG contendo o vetor de expressão pAU5 (BCG/pAU5). Após padronização, a multiplicidade de infecção utilizada para os experimentos foi de 10 bacilos para 1 célula THP-1 (10MOI). A expressão da proteína Sm14 foi detectada em todos os protótipos vacinais. Para assegurar que o protótipo BCG/sm14 era capaz de diferenciar a linhagem de monócitos THP-1 em macrófagos, avaliamos a taxa de crescimento celular e foi possível observar que após a infecção estas células apresentavam o índice de proliferação diminuído em 2 logs em relação à célula não infectada. O protótipo vacinal BCG/sm14 não mostrou diferenças quanto a capacidade de infecção, a taxa de persistência intracelular e a estabilidade da construção plasmidial. As duas metodologias empregadas mostraram resultados discrepantes em relação ao percentual de citocinas expressas após a infecção com o protótipo vacinal ou os BCG controles, mostrando um maior percentual de células positivas quando avaliados por citometria de fluxo. Contudo, mesmo com esta diferença observamos que o protótipo vacinal BCG/sm14 não alterou o perfil de expressão de IL-10, IL-12 e TNF- α . O fato do plasmídeo pAU5 ser um vetor de expressão citoplasmática, sugere que a proteína Sm14 não foi capaz de estimular a mudança de citocinas em monócitos humanos. Experimentos futuros devem investigar o papel do BCG/sm14 em macrófagos maduros, quanto a indução de citocinas pró e anti-inflamatórias, TLR, bem como na indução da resposta imune adaptativa, como a apresentação antigênica, na tentativa de melhor entender a resposta imune a esta vacina candidata.

ABSTRACT

Cell cultures has been used extensively in the development of a broad range of therapeutic and prophylactic products, and are an important tool for geneticists, immunologists, vaccinologists and the pharmaceuticals industry. *In vitro* cell assay has been applied as an alternative method to replace or diminish the use of animal model in the developmental, production in vaccine test phases, with promising results. Otherwise, computational methods should amplify the use of cell cultures tools to test candidate vaccines. The main goal of this work was to develop an *in vitro* protocol using human cell line – monocytic cell THP-1, to select a vaccine prototype – strain Pasteur *Mycobacterium bovis* BCG expressing *Schistosoma mansoni* Sm14-antigen (BCG/sm14). Two methodologies were employed – a flow cytometry and immunocytochemistry, to quantify the expression of IL-10, IL-12 e TNF- α . Pasteur *M. bovis* BCG and the strain Pasteur do *M. bovis* BCG containing the expression vector pAU5 (BCG/pAU5) were used as controls. Multiplicity of infection (MOI) was determined and showed a better 10 bacilli to 1 cells ratios, regarding the expression of intracellular cytokines. Sm14 protein expression was detected in all vaccine prototype before use. To assure that BCG/sm14 was able to differentiate monocytic THP1 cell line in mature macrophage, we evaluated the proliferative ration after BCGs infection and all strain showed the ability to induce monocytic THP1 cells maturation, diminishing in 2.0 logs the cell proliferation. No differences were seen in the uptake, intracellular persistence and plasmidial stability. Interestingly, we observe discrepant results regarding the amount of positive cells expressing cytokines detected by the two methods used, independent of which BCG was tested. The overall results obtained by the cytometric method was high than immunocytochemistry. However, beside these ambiguous results, no alteration in the IL-10, IL-12 and TNF-alfa profile was observed when BCG/sm14 was compared with BCG. These results point to the plamidial BCG construction pAU5 and its intracellular expression, suggesting no modification in the cytokine profile in human monocytic cell lines. Further experiments should be addressed to identify the role of BCG/sm14 in modulate mature macrophage and, the induction of adaptive immune response, as antigen presentation, pro- and anti-inflammatory cytokines, TLR expression and activation, to better understating the vaccine prototype immune response .

1. INTRODUÇÃO

A vacinologia é uma ciência combinatória que estuda a diversidade de agentes patogênicos, o sistema imune humano e preparações vacinais que possam modular a resposta imune para prevenir ou curar as doenças causadas por esses patógenos (Brusic, August & Petrovsky 2005). Sendo a vacina um imunógeno não-patogênico que ao ser inoculado em um indivíduo é capaz de induzir imunidade protetora contra um patógeno específico (Parslow 2004), a vacinação, bem como a limitação à exposição de pessoas saudáveis às infectadas e eliminação da fonte ou meios de disseminação do agente infeccioso, contribui para a prevenção de doenças. As propriedades necessárias para uma vacina ideal são: promover imunidade ao longo da vida, ser largamente protetora contra todas as variantes do patógeno, prevenir a transmissão de doença, induzir a imunidade rapidamente, ser eficaz em todas as pessoas vacinadas, transmitir a proteção materna ao feto, possuir baixo custo, ser estável, ser segura e necessitar de poucas ou, de maneira ideal, uma só administração que induza proteção. (Ada 2001, Beverley 2002, NIAID 2003).

O desenvolvimento das vacinas ao longo da história pode ser destacado de acordo com as revoluções tecnológicas aplicadas na vacinologia (Plotkin 2005a). No final do século XVIII o médico inglês Edward Jenner realizou a experiência que foi considerada o marco da imunologia como ciência. Jenner inoculou, a partir de arranhões feitos no braço de um menino de oito anos (James Phipps), o líquido extraído da vesícula causada pela varíola bovina da mão da ordenhadeira Sarah Nelmer (André 2003, Plotkin & Plotkin 2004). Contudo, somente quase um século após a descoberta de Jenner, Louis Pasteur desenvolveu o conceito que levaria à primeira revolução da vacinologia: a atenuação da virulência de patógenos, criando a primeira vacina em laboratório e instituindo o conceito de vacinação. Pasteur estabeleceu as bases do que ficou conhecida como abordagem clássica para o desenvolvimento de vacinas, que incluem o isolamento do patógeno, a perda da virulência (atenuação) e a imunização com partes do microrganismo ou o microrganismo inteiro (Plotkin & Plotkin 2004, Plotkin 2005b, Serruto & Rappuoli 2006).

No final do século XVIII, Salmon e Smith descreveram o conceito que levaria a segunda revolução tecnológica da vacinologia, a inativação do patógeno para o desenvolvimento de preparações vacinais. A expansão deste conceito levou a

construção de vacinas feitas a partir de toxinas detoxificadas (toxóides) e frações subcelulares como polissacarídeos, proteínas e conjugados (Plotkin & Plotkin 2004, Plotkin 2005a, Plotkin 2005b). A adaptação de cultura de células para o cultivo de vírus visando a obtenção de preparações vacinais foi considerada a terceira grande revolução tecnológica utilizada pela vacinologia (Plotkin & Plotkin 2004, Plotkin 2005a, Plotkin 2005b). A introdução de novas estratégias para o desenvolvimento de vacinas a partir da utilização de técnicas de biologia molecular como: clonagem de genes e expressão de proteínas recombinantes, criação de partículas defectivas, desenvolvimento de vetores vivos atenuados, sequenciamento de genomas, genômica comparativa, proteômica e vacinologia reversa; abriram novas fronteiras na vacinologia para a busca de preparações imunogênicas que sejam efetivas no combate às doenças infecciosas. Essa nova onda de desenvolvimento está sendo considerada como a quarta revolução tecnológica da vacinologia (Ellis 2004, Plotkin 2005a, Plotkin 2005b, Serruto & Rappuoli 2006).

A compreensão e a importância da resposta imune após a vacinação sofreram um avanço notável nos últimos anos (Saalmüller 2006), marcando assim uma nova era para o desenvolvimento de vacinas. Para Plotkin (2005b), o novo foco dos vacinologistas está no desenvolvimento de meios, como vetores, replicons, lipopeptídeos e adjuvantes que dirijam a polarização do sistema imune para uma resposta do tipo 1, ou seja, a estimulação da imunidade celular. Plotkin destaca também o desenvolvimento de novas rotas de imunização tais como intranasal, aerossol, transcutânea, oral e retal (Plotkin 2005b). Já para Rappuoli (2004), a vacinologia atual está focada no processo de obtenção de imunógenos a partir da investigação pan-genômica, análise por microarranjos de DNA (DNA *microarray*) e proteômica, numa abordagem conhecida como vacinologia reversa. Serruto e Rappuoli (2006) enfatizam que o futuro do desenvolvimento de vacinas está na chamada vacinologia estrutural, na qual através da resolução atômica e da estrutura dos antígenos potenciais, será realizado o desenho racional dos epítomos alvos usados como candidatos vacinais. Observa-se então que a integração entre a tecnologia básica, os avanços tecnológicos na biologia molecular e o aumento do entendimento da resposta imune são a base para o desenvolvimento de novos candidatos a preparações vacinais (Rosenthal & Zimmerman 2006).

A imunidade, ou resposta imune, pode ser dividida em dois tipos: a imunidade inata e a imunidade adquirida ou adaptativa. A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa contra agentes patogênicos e consiste no desencadeamento de

mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que já existiam antes do estabelecimento de uma infecção e que atuam da mesma forma em infecções sucessivas. As barreiras anatômicas (pele e epitélio de mucosa), barreiras fisiológicas (temperatura, áreas com baixo pH, mediadores químicos), fagócitos mono e polimorfonucleares e barreiras inflamatórias são parte da imunidade inata (Parslow 2004, Abbas & Lichtman 2005b, McCullough & Summerfield 2005). As células da imunidade inata utilizam receptores de reconhecimento padrão (*pattern-recognition receptors* – PRR) do tipo Toll (*Toll like receptors* - TLRs) para o reconhecimento de estruturas microbianas altamente conservadas que não estão presentes em células de mamíferos, como padrões moleculares associados ao patógeno (*pathogen-associated molecular patterns* – PAMPs). Os TLRs possuem a capacidade de reconhecer diferentes PAMPs, como seqüências CpG de DNA não metiladas, lipídeos e carboidratos complexos como lipopolissacarídeos (LPS) e ácidos teicóicos (Reis e Sousa 2004b, Krutzik *et al.* 2005, Rosenthal & Zimmerman 2006).

A imunidade adaptativa caracteriza-se por sua alta especificidade e por ampliar a magnitude da resposta após sucessivas exposições a um determinante antigênico. Além dos muitos mecanismos da imunidade natural necessários à eliminação dos microorganismos invasores, a imunidade adaptativa utiliza a seleção e a mutação somática na geração de seu repertório imune desenvolvendo duas outras propriedades adicionais: a memória em relação aos contatos anteriores com um determinado antígeno, de modo que as exposições subseqüentes estimulem respostas de defesa gradativamente mais efetivas, e a capacidade de amplificar os mecanismos protetores da imunidade natural, direcionando-os para os locais de entrada do antígeno e melhorando o processo de eliminação dos elementos estranhos ao organismo hospedeiro (Costa-Carvalho & Solé 2000). A imunidade adaptativa é classificada como humoral ou celular em função do componente do sistema imunológico intermediador da resposta imune. A imunidade humoral é mediada por anticorpos, que são capazes de efetuar o reconhecimento específico agindo na neutralização de microorganismos e toxinas, na ativação do sistema do complemento e na opsonização de antígenos para aumento da fagocitose. A imunidade celular ou mediada por células (*cell-mediated immunity* – CMI) refere-se à resposta imune efetora das células T atuando na ativação de fagócitos, estimulação das atividades microbicidas dos macrófagos, células T e células *natural killer* (NK) na destruição de células infectadas. A CMI atua na defesa contra microorganismos

intracelulares, na imunidade antitumoral e na rejeição de aloenxertos (Parslow 2004, McCullough & Summerfield 2005).

As células T podem ser classificadas em dois grandes grupos de acordo com a expressão dos antígenos de superfície: T CD4 e T CD8. As células T CD8 efetoras são funcionalmente conhecidas como células T citotóxicas (T *cytotoxic* – Tc). As células Tc atuam principalmente na lise de células infectadas com patógenos presentes em seu citoplasma, desempenhando sua função através da liberação de dois tipos de citotoxinas: as granzimas, que são capazes de induzir apoptose na célula-alvo e as perforinas, que perfuram a membrana celular da célula-alvo facilitando a ação das granzimas (Esser *et al.* 2003, Kaufmann & Flynn 2005). Já as células T CD4 efetoras são funcionalmente conhecidas como células T auxiliares (T *helper* – Th). As células Th desempenham um papel central na função de vários processos como ativação, inibição, regulação, diferenciação e proliferação de diferentes tipos celulares como as células T CD8, células B, células NK, eosinófilos e macrófagos, tanto por contato célula-célula como pela produção de citocinas (Esser *et al.* 2003, Kidd 2003). As células Th são divididas principalmente em duas sub-populações fenotipicamente distintas, T *helper* tipo 1 (Th1) ou T *helper* tipo 2 (Th2), que proporcionam a estruturação de um modelo útil na compreensão da imunorregulação dependente de célula T (Mosmann & Coffman 1989, Mosmann 1991, McCullough & Summerfield 2005).

O conceito de células Th1/Th2 baseia-se na dicotomia do perfil de citocinas expressas, uma vez que cada sub-população de célula Th amplifica a si mesma e promove a regulação cruzada da sub-população recíproca. As citocinas produzidas por células Th1 são reconhecidamente capazes de suprimir a proliferação celular, a síntese de citocinas e/ou a atividade biológica induzidas por citocinas da resposta Th2, e vice-versa. Nas respostas imunes geradas pelas células Th1 as principais citocinas produzidas são as interleucinas (IL) 2 e o interferon gama (IFN- γ) direcionando o sistema imune para uma resposta mediada por células. A produção de anticorpos não é uma característica proeminente da resposta Th1, mas sua combinação com a resposta celular é necessária no combate de infecções intracelulares e fúngicas e de células cancerosas através de mecanismos diretos (destruição de células infectadas) e indiretos como a ação do interferon na proteção de células não infectadas (Esser *et al.* 2003, Kidd 2003, Rosenthal & Zimmerman 2006). Já as respostas imunes geradas pelas células Th2 são especialmente eficazes contra parasitas extracelulares e toxinas por mecanismos dependentes de

anticorpo e as citocinas dominantes produzidas são IL-4, IL-5, IL-10, e IL-13, direcionando para uma alta produção de anticorpos (Esser *et al.* 2003, Kidd 2003, Clingan *et al.* 2006, Rosenthal & Zimmerman 2006).

As células T não possuem receptores capazes de reconhecer diretamente antígenos. Os receptores de antígenos das células T (*T cell receptors* – TCRs) reconhecem somente fragmentos de antígenos expostos na superfície de outras células associados principalmente a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (*Major histocompatibility complex* - MHC). Há dois tipos principais de moléculas de MHC, denominadas de moléculas de MHC de classe I e moléculas de MHC de classe II e seu padrão de expressão está intimamente ligado às funções das células T. As moléculas MHC de classe I são expressas por todas as células do organismo exceto hemácias, sendo complexadas a antígenos encontrados no citoplasma celular e reconhecidas pelas células Tc. As moléculas MHC de classe II são expressas principalmente por células especializadas conhecidas como células apresentadoras de antígenos (*antigen presenting cells* – APC), que apresentam antígenos oriundos de vesículas endocíticas as células Th (Esser *et al.* 2003).

As APCs são células especializadas na captura de microorganismos e outros antígenos, na apresentação desses antígenos às células T e na expressão de sinais que estimulam a proliferação e diferenciação de linfócitos (Takahashi 2003, Abbas & Lichtman 2005b), possuindo um papel crucial na interação entre as imunidades inata e adaptativa. Seus principais representantes são as células dendríticas, os linfócitos B e os macrófagos (Guermonprez *et al.* 2002, Abbas & Lichtman 2005b). As células dendríticas são conhecidas como APCs profissionais por possuírem como função a captura e a apresentação de antígenos às células T virgens, promovendo juntamente com sinais co-estimulatórios, a expansão clonal e a diferenciação em células T efetoras (Guermonprez *et al.* 2002, Takahashi 2003, Reis e Sousa 2004a). As células B, dentre outras funções, são capazes de apresentar antígenos às células T efetoras sendo essenciais para a produção de anticorpos dependentes de células Th (Parlow 2004).

Os macrófagos são células fagocitárias mononucleadas, derivados dos monócitos sanguíneos e são encontrados nos tecidos desempenhando importantes papéis nas respostas imunes inata e adquirida. Possuem um papel central na resposta inicial à infecção antes da ação da imunidade mediada pelas células T e B, sendo importantes na fase de indução de inflamação, reorganização e reparo dos

tecidos, além de realizarem funções efetoras. São classificados como células apresentadoras de antígenos e têm diversas atividades, como atividade antimicrobiana e antitumoral, modulação de várias células, e promoção de quimiotaxia (Auwerx 1991, Mills *et al.* 2000, Berges *et al.* 2005).

Os macrófagos foram denominados M1 e M2 de acordo com o seu padrão de ativação (Mills *et al.* 2000). Assim, macrófagos M1 provenientes de células Th1 apresentam uma resposta efetora caracterizada pela produção dominante de óxido nítrico (NO) em resposta ao LPS ou IFN- γ exógeno. Macrófagos M2, de linhagens Th2, por sua vez, exibem um perfil tolerante caracterizado pela produção de altos níveis de fator transformador de crescimento beta (*transforming growth factor beta* - TGF- β) (Bastos *et al.* 2002, Mantovani, Sica & Locati 2005). O padrão de ativação assumido por esses macrófagos parece ser independente de linfócitos, uma vez que macrófagos de camundongos apresentam a mesma polarização. Esse fato sugere a importância das citocinas produzidas por essas células na regulação de suas funções. A influência da IL-10, IL-12, IL-18, IFN- α e IFN- γ na regulação autócrina de macrófagos tem sido descrita, demonstrando que os macrófagos não apenas obedecem às ordens dos linfócitos T, como podem até mesmo comandar o tipo de resposta dessas células. Adicionalmente, através das citocinas produzidas por eles, são aptos a se auto-regularem (Di Marzo *et al.* 1994, Fantuzzi *et al.* 2000, Mills *et al.* 2000, Xing, Zganiacz & Santosuosso 2000, Bastos *et al.* 2002, Mantovani, Sica & Locati 2005).

As citocinas constituem um grupo de proteínas de baixo peso molecular, geralmente glicosiladas, secretadas por diferentes células do sistema imune, como linfócitos, monócitos e macrófagos. Suas ações são geralmente pleiotrópicas, podendo atuar de forma autócrina, parácrina e endócrina, na mediação de diferentes efeitos biológicos (Abbas & Lichtman 2005a). Dentre as citocinas utilizadas para a avaliação de protótipos vacinais na ativação de APCs, podemos destacar TNF- α , IL-10 e IL-12 (Henriques & Sampaio 2002, Abbas & Lichtman 2005a). A IL-10 é uma citocina reguladora secretada por macrófagos ativados e por algumas células Th. Tem ação anti-inflamatória, agindo na inibição de macrófagos e células dendríticas ativados, inibindo a ação de IL-12, TNF- α e IFN- γ , com efeitos associados ao término das reações da CMI (Standiford 2000, Atkinson *et al.* 2000, Abbas & Lichtman 2005a). A IL-12 é a principal citocina mediadora da resposta imune inata a patógenos intracelulares, dentre os quais as micobactérias, sendo um importante indutor de CMI. Atua na ativação de células T citotóxicas e células NK induzindo a

produção de INF- γ , o qual ativa os macrófagos infectados e na diferenciação das células Th1, possuindo um importante papel na interação entre a imunidade inata e adaptativa (Atkinson *et al.* 2000, Abbas & Lichtman 2005a). O TNF- α é uma das principais citocinas mediadoras da resposta pró-inflamatória produzida principalmente por fagócitos mononucleares ativados além de células T, células NK e mastócitos. Atua principalmente no recrutamento de neutrófilos e monócitos para os sítios de infecção, na indução de macrófagos e células endoteliais para secreção de quimiocinas e na indução de apoptose em algumas células (Atkinson *et al.* 2000, Standiford 2000, Abbas & Lichtman 2005a).

Os monócitos e macrófagos possuem um papel crucial na apresentação de antígenos estranhos a outras células do sistema imune e na produção de sinais que direcionam o padrão da resposta imune necessária para cada tipo de patógeno. Dentre os sinais podemos destacar as citocinas, que são proteínas imunomoduladoras que ajudam a direcionar a resposta imune em diversos processos inflamatórios incluindo processos infecciosos (Xing, Zganiacz & Santosuosso 2000, Berges *et al.* 2005). Por essas características, os macrófagos vêm sendo utilizados para avaliar o perfil imunogênico de diferentes antígenos candidatos à vacina (Campbell, Mann & Chadee 2000, Misumi *et al.* 2003, Ciabattini *et al.* 2006). Adicionalmente, é importante considerar que entre os principais requerimentos para o sucesso da vacinação está a ativação das APCs, que envolve o processamento de antígenos, a expressão de fatores co-estimulatórios, e a secreção de citocinas, que é essencial para o início da resposta imune (Ada 2004).

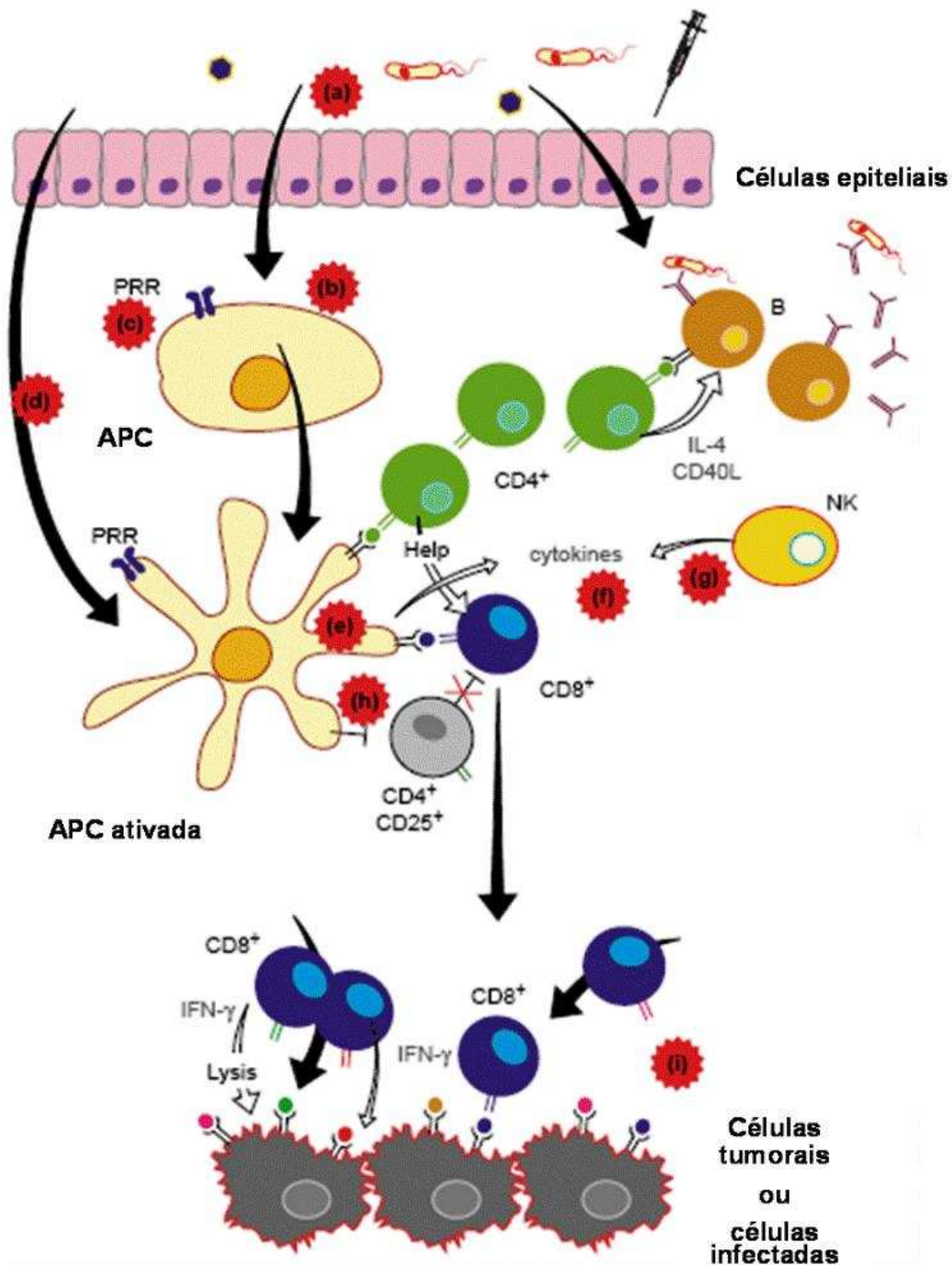


Figura 1.1: Visão esquemática da indução do sistema imune gerada por um patógeno ou uma vacina (Adaptado de Wack & Rappuoli 2005). As letras de (a) a (i) indicam situações onde o melhoramento de vacinas pode levar a respostas imunes mais eficientes. (a) A via de inoculação pode influir no tipo de resposta imune e reduzir o número de doses. (b) O antígeno particulado é reconhecido mais facilmente por APCs em relação ao antígeno solúvel. (c) Aumento da ativação de APCs através do reconhecimento de imunoestimulantes pelas PRRs. (d) A maturação e o carreamento de antígenos *in vitro* pelas APCs são candidatos vacinais promissores. (e) A vacinação de DNA leva a uma maior eficiência na apresentação de antígenos pelas moléculas de MHC de classe I. (f) O uso de citocinas como adjuvante natural de vacinas. (g) O recrutamento de células NK pode ser relacionado à produção inicial de citocinas do tipo Th1. (h) As vacinas podem atuar no efeito regulatório das células Treg CD4 CD25 visando a quebra da tolerância imunológica. (i) A pré-existência de células T específicas para antígenos expressos por células tumorais não contidos na vacina expande-se após a vacinação, predominando na resposta anti-tumor.

O advento da cultura celular no início do século passado surgiu como um método para estudar o comportamento de células dos animais sem as variações sistêmicas que poderiam surgir no animal tanto durante a homeostase, como durante um estado de estresse de um experimento (Harrison 1910, Carrel 1912 *apud* Freshney 2000b). As culturas de células vêm sendo utilizadas extensivamente para o desenvolvimento e a produção de uma variedade de produtos terapêuticos e profiláticos incluindo hormônios, citocinas, enzimas, antibióticos e vacinas tornando-se, por essa razão, uma ferramenta indispensável para geneticistas, imunologistas, vacinologistas e, especialmente, para a indústria farmacêutica (Freshney 2000a, FDA 2006).

Em 1991, Auwerx comparou diferentes linhagens de células mielóides de origem humana (HL-60, U-937, KG-1, HEL e THP-1) e concluiu que as células THP-1, após o tratamento com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), podem servir de modelo para o estudo *in vitro* dos mecanismos de regulação gênica, funções fisiológicas e diferenciação monócito/macrófago, assim como podem ser utilizadas no estudo dos vários aspectos biológicos do macrófago como o seu papel nos mecanismos de defesa e como célula secretora (Stokes & Doxsee 1999, Medeiros, 2001, Oliveira, Charlab & Pessolani, 2001, Ritelli *et al.* 2003, Theus, Cave & Einsenach, 2004, Berges *et al.* 2005, Zhao *et al.* 2005, Amadori *et al.* 2006).

A célula THP-1 é um monócito obtido a partir do sangue de uma criança com leucemia aguda (Tsuchiya *et al.* 1980, ATCC 2006). Na sua caracterização foi descrito que essas células apresentam capacidade fagocítica, expressão de lisozima e teste negativo para o vírus Epstein-Barr (Tsuchiya *et al.* 1980). Além disso, não possuem atividade citolítica dependente de anticorpo e sua diferenciação pode ser induzida por compostos do tipo ésteres de forbol como, por exemplo, 12-O-tetradecanolforbol-13-acetato (TPA) ou PMA (Tsuchiya *et al.* 1980, Stokes & Doxsee 1999, ATCC 2006).

Theus, Cave & Einsenach (2004) destacaram que as vantagens do uso da linhagem celular THP-1 como modelo de diferenciação monócito/macrófago *in vitro* são a invariabilidade da sua função de macrófago e a reprodutibilidade do crescimento celular o que permite seu estudo em diferentes estágios (normal *versus* ativado). Além disso, foi demonstrado que a diferenciação da THP-1 pode ser utilizada como modelo experimental para maturação de células dendríticas humanas

(Berges *et al* 2005) e como modelo para a avaliação da resposta inflamatória a diferentes ácidos graxos poliinsaturados (Zhao *et al.* 2005).

Stokes e Doxsee (1999) demonstraram que as células THP-1 podem ser utilizadas como modelo para investigar as interações micobacterianas em macrófagos e Medeiros (2001) utilizou-as como substrato para a avaliação da estabilidade estrutural e funcional de cepas de *Mycobacterium bovis* bacilo Calmette-Guérin (BCG) recombinante (BCGr) expressando antígeno de *Bordetella pertussis*. Oliveira, Charlab & Pessolani (2001) compararam o nível de expressão de TNF- α em células THP-1 infectadas com BCG e *Mycobacterium leprae* e, posteriormente, o uso das células THP-1 foi proposto para o desenvolvimento de uma alternativa rápida para a detecção de *M. bovis* no diagnóstico de tuberculose bovina (Ritelli *et al.* 2003, Amadori *et al.* 2006), e como modelo para avaliação da virulência e da persistência intracelular de micobactérias modificadas geneticamente (Lewis *et al.* 2003).

O Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) vem trabalhando desde 1995, com o apoio dos programas PAPES (Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde) e PDTIS (Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e de Bio-Manguinhos, na tecnologia para modificação genética da vacina BCG com o objetivo de desenvolvimento de vacinas vetorizadas contra agentes infecciosos e parasitários. Nesse processo vários cepas de BCG recombinante (BCGr) foram construídas visando a expressão de antígenos protetores de diversos patógenos como *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, o vírus da Hepatite B, entre outros (Medeiros 2001, Santos 2002, Rezende *et al.* 2005, Medeiros *et al.* 2005). Como parte desse mesmo projeto Argondizzo desenvolveu, em 2005, diferentes protótipos vacinais de BCGr expressando a proteína Sm14 de *Schistosoma mansoni* (Figura 1.2) como possíveis alternativas vacinais para a imunoprofilaxia da esquistossomose.

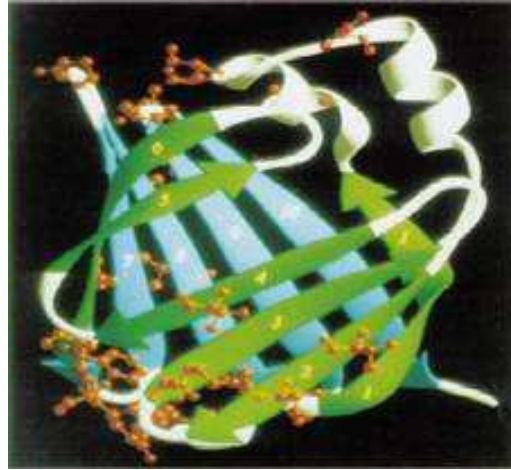


Figura 1.2: Diagrama do modelo molecular da proteína Sm14 (Adaptado de Tendler *et al* 1996)

A esquistossomose é um problema mundial. Estima-se atualmente que pelo menos 200 milhões de pessoas estejam infectados pelo *Schistosoma mansoni* e que mais de 600 milhões de indivíduos estejam em risco no Brasil e no mundo (Argondizzo 2005, Varaldo *et al.* 2006). Dentre as razões para a obtenção de uma vacina efetiva contra o *Schistosoma mansoni* está a elevada frequência da doença na população de muitas regiões, principalmente em países em desenvolvimento, podendo levar os pacientes com a forma hepatoesplênica a um padecimento crônico grave e mortal, sendo assim um grande desafio para a Saúde Pública (WHO 2000). No entanto, a Organização Mundial da Saúde (WHO) através de seu Programa Especial para Treinamento e Pesquisa (TDR), identificou seis antígenos como candidatos para o desenvolvimento de uma vacina. Dentre esses antígenos destaca-se a proteína Sm14, que é uma proteína ligante a ácidos graxos (FABP), de 14 kDa presente no esquistossômulo adulto (Chitsulo *et al.* 2000, WHO 2000, Al-Sherbiny *et al.* 2003).

Na busca de uma vacina candidata contra a esquistossomose, a estratégia de utilização da vacina BCG como vetor para a expressão de antígenos de *S. mansoni* *in vivo* é provavelmente uma das iniciativas mais importantes e de melhor relação custo - benefício no momento para o controle da esquistossomose em países sub-desenvolvidos ou em desenvolvimento (Kremer *et al.* 1998, Dai *et al.* 2003, Varaldo *et al.* 2004, Argondizzo 2005, Varaldo *et al.* 2006). Isso ocorre porque o BCG apresenta um elenco de vantagens de difícil superação entre os vetores vivos atenuados disponíveis no momento, tais como o fato de já ter sido administrado a

bilhões de pessoas no mundo inteiro com baixo índice de efeitos colaterais, poder ser administrado em qualquer época após o nascimento, não ser afetado pelos anticorpos maternos, apresentar baixo custo de produção e ser uma das vacinas mais termoestáveis que se conhece (Smith & Starke 2004, Bonah 2005, SLIPE & API 2005, WHO 2006). Além disso, possui baixo custo de produção, é estável do ponto de vista da atenuação, é controlável por antibióticos, apresenta tropismo por células responsáveis pela montagem da resposta imune (células dendríticas, macrófagos e células linfóides) e é capaz de induzir uma resposta imune celular e humoral contra bactérias, vírus, parasitas e toxinas (Ohara & Yamada 2001, Smith & Starke 2004, SLIPE & API 2005, WHO 2006). Essas características fazem do BCG um dos mais promissores vetores vivos atenuados para uma plataforma vacinal visando a liberação de antígenos heterólogos protetores *in vivo* (Medeiros 2001, Ohara & Yamada 2001, Santos 2002, Smith *et al.* 2001, Argondizzo 2005, Varaldo *et al.* 2004, Varaldo *et al.* 2006).

A capacidade do *M. bovis* BCG sub-cepa Pasteur transformado com plasmídeo pPL73 expressando a proteína Sm14 de *S. mansoni* (BCGr/pPL73-sm14) de induzir efeito protetor semelhante ou maior do que a proteção induzida por três doses da mesma proteína produzida e purificada a partir de *Escherichia coli*, foi avaliada na Fundação Oswaldo Cruz utilizando modelo murino para estudos de proteção, via intraperitoneal, com uma ou duas doses do BCGr/pPL73-sm14, em combinação ou não, com uma dose de reforço da proteína recombinante Sm14 purificada. Nessas condições demonstrou-se que o BCGr/pPL73-sm14 em dose única foi capaz de induzir aproximadamente 50% de proteção. No entanto, apesar dos camundongos vacinados com BCGr/pPL73-sm14 via intraperitoneal não apresentarem anticorpos anti-Sm14, esplenócitos desses animais liberaram IFN- γ quando estimulados com a proteína recombinante Sm14r, sendo assim capaz de induzir níveis de proteção similares àqueles induzidos pela proteína Sm14r, com a vantagem do BCGr/pPL73-sm14 ser administrado em dose única (Varaldo *et al.* 2004).

Apesar da existência na FIOCRUZ de modelo murino de proteção padronizado e aprovado internacionalmente para a avaliação de protótipos vacinais contra a esquistossomose, o grande desafio do projeto para uma nova vacina, com o protótipo BCG/sm14, é a demonstração de proteção em modelo humano. Por essa razão, objetivamos nesse trabalho o desenvolvimento de um protocolo visando o uso de células humanas na avaliação e seleção de vacinas candidatas contra a

esquistossomose. Com essa finalidade, utilizamos como substrato monócitos humanos derivados da linhagem THP-1 para avaliação e quantificação da expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α verificadas após a infecção das células THP-1 com o protótipo vacinal BCG/*sm14*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Demonstrar a viabilidade de um sistema de avaliação *in vitro* para protótipos vacinais baseado no perfil de citocinas expressas pela linhagem celular de monócitos humanos THP-1.

2.2 Objetivos Específicos

- Criar um protocolo de infecção com o *Mycobacterium bovis* BCG em células THP-1
- Avaliar a estabilidade funcional, o grau de infecciosidade e a persistência intracelular do protótipo vacinal BCG/*sm14* em células THP-1
- Avaliar a capacidade do protótipo vacina BCG/*sm14* de induzir a diferenciação e maturação de células THP-1
- Avaliar, quantificar e comparar a expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α após infecção com protótipo vacinal BCG/*sm14* e com os BCGs controles (BCG Pasteur e construção BCG/pAU5) em células THP-1

3. METODOLOGIA

3.1 Cultivo da célula THP-1

A linhagem celular THP-1 (ATCC nº. TIB 202) foi obtida do acervo do Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) de Bio-Manguinhos, Fiocruz mantidos em nitrogênio líquido (-196°C) por no máximo de 12 meses. As células foram descongeladas de criotubos Posteriormente, foram realizadas três lavagens com PBS [137mM de NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 2.7mM KCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 10mM Na₂HPO₄ (Merck) e 1.8mM KH₂PO₄ (Merck)] 1X pH 7.4. Para a manutenção celular foram testados, diversos meios de cultura (MEM, D-MEM e RPMI 1640) e suplementos [soro fetal bovino inativado – SFB (Gibco Life Technology / Invitrogen, Grand Island, EUA), HEPES (Gibco), L-glutamina Sigma-Aldrich), NaHCO₃ (Merck), 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), piruvato de sódio (Sigma-Aldrich), estreptomicina/penicilina (Gibco), gentamicina (Gibco)]. Após observação morfológica das células por microscopia óptica (400 x), definiu-se que para os experimentos propostos seria utilizado o meio de cultura foram cultivadas inicialmente em meio RPMI 1640 (Gibco) formulado com 0,2% (v/v) de NaHCO₃ (Sigma-Aldrich), suplementado com 20% (v/v) de SFB e mantidas em garrafas T de 25 cm² (Corning, Corning, EUA) a 37°C em atmosfera com 5% de gás carbônico (CO₂) por 3 dias.

Quando da necessidade de se ampliar o acervo desta linhagem, as células foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos, lavadas duas vezes em PBS e ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB. A concentração e viabilidade celular foram determinadas em hemocítmetro por microscopia óptica (100 x) utilizando-se a diluição de 1:50 em azul de tripan 0,4% (Gibco). Para a criação dos lotes de trabalho, após as etapas de centrifugação e lavagem, as células foram ressuspensas na concentração de 1 x 10⁷ células/mL em solução de criopreservação [90% SFB e 10% dimetil sulfoxido (DMSO - Sigma-Aldrich)] e mantidas em nitrogênio líquido a – 196°C.

No preparo das células para a realização dos experimentos, as células foram removidas do meio de cultura original, lavadas duas vezes em PBS, ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB. Após a quantificação as células foram ressuspensas na concentração de 1 x 10⁶ células/mL em RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB.

3.2. Cultivo das cepas de BCG

Para a presente proposta foi utilizado o protótipo vacinal *M. bovis* BCG sub-cepça Pasteur 1173P2 transformada com o vetor plasmidial pAU5 contendo o gene *sm14* de *S. mansoni* (BCG/*sm14*). Como controle dos experimentos, foram utilizados a amostra vacinal *M. bovis* BCG sub-cepça Pasteur 1173P2 (BCG-P), assim como o *M. bovis* BCG sub-cepça Pasteur transformado o plasmídeo pAU5 (BCG/pAU5). Os BCGs recombinantes foram desenvolvidos no LATER pelos pesquisadores Dr. Douglas MacIntosh e Msc. Ana Paula C. Argondizzo (Argondizzo 2005) (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Características das cepas de BCG

Cepas	Características
BCG-P	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepça Pasteur 1173P2
BCG/pAU5	<i>M. bovis</i> BCG sup-cepça Pasteur Vetor pAU5: <i>kanR</i> , <i>oriE</i> , <i>oriM</i> , <i>Phsp60</i> *
BCG/ <i>sm14</i>	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepça Pasteur Vetor pAU5/ <i>sm14</i> : <i>kanR</i> , <i>oriE</i> , <i>oriM</i> , <i>Phsp60</i> *, <i>sm14</i>

pAU5 - vetor de expressão citoplasmático

kanR - gene de resistência à canamicina derivado do Tn903

oriE - origem de replicação do bacteriófago T4 de *Escherichia coli*

oriM - origem de replicação do plasmídeo pAL5000 de *Mycobacterium fortuitum*

*Phsp60** - promotor *hsp60* de *Mycobacterium bovis* BCG modificado

sm14: gene de *Schistosoma mansoni*

Os BCGs foram estocados em alíquotas e armazenados a -70°C. No momento do uso as alíquotas foram descongeladas e cultivadas em 20 mL de caldo Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA) suplementado com 10% (v/v) da solução Albumina – Dextrose – Catalase (ADC - Difco), 0,05% (v/v) de Tween 80 (Merck) e 0,2% (v/v) de glicerol (Sigma-Aldrich) a 37⁰ C e 5% CO₂ por 10 dias, quando atingem a fase exponencial de crescimento.

Para o preparo dos inóculos, o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG e BCG-pAU5) foram obtidos a partir de culturas em fase exponencial. Os BCGs foram

centrifugados a 1950 x g e lavados duas vezes em PBS. Após a lavagem, a concentração de cada amostra de BCG foi ajustada com PBS para o padrão 1 da escala de MacFarland (MacFarland, 1907), ou seja, $3,0 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro. Uma alíquota de 10 μ L desta suspensão bacteriana foi quantificada em hemocitômetro por microscopia ótica (100x), para confirmação da leitura por turbidez.

Devido à dificuldade para a determinação da viabilidade dos BCGs em UFC utilizando o meio Middlebrook 7H10 (Difco) suplementado com 10% (v/v) de ADC preparado no laboratório, buscaram-se diferentes alternativas, como a substituição do lote do meio Middlebrook 7H10, utilização do meio Middlebrook 7H11 e suplementação dos meios com ADC e OADC comercial (Difco).

Em cada experimento, o número de bactérias viáveis foi determinado através de plaqueamento de diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) em triplicata, em meio ágar Middlebrook 7H11 (Difco) suplementado com 10% (v/v) da solução de Ácido oléico - Albumina - Dextrose - Catalase (OADC – Difco) e 0,2% (v/v) de glicerol. As placas foram incubadas por quatro semanas em estufa a 37°C em 5% CO₂.

3.3 Avaliação da expressão da proteína recombinante Sm14 em BCG/sm14

Para a confirmação da expressão da Sm14 pela cepa BCG/sm14 foi utilizado a técnica de *western blotting* com base no protocolo descrito por Argondizzo (2005). Amostras de 4 mL das culturas bacterianas foram centrifugadas por 5 minutos a 6500 x g a temperatura ambiente sendo o precipitado rompido por lise mecânica utilizando-se 0,5 g de pérolas de vidro de 0,5 mm de diâmetro (BioSpec Products – Bartlesville, EUA), 60 μ L de tampão Tris-HCl 1 mM 50 mM pH 6.8 e 20 μ L de tampão de amostra 4X (Tris-HCl 50mM pH 6,8, DTT 100mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%). As amostras foram agitadas inicialmente por 45 segundos sendo colocadas em gelo por um minuto e posteriormente agitadas por 30 segundos, utilizando-se o aparato “Mini Beadbeater” (Biospec Products, Bartlesville, Canada). Em seguida, as amostras foram fervidas por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida 13,5% [técnica de SDS-PAGE (Laemmli 1970)] com espaçador de 1 mm. A corrida foi realizada a 100 volts, no gelo. O material do gel foi transferido para membrana de duralose (Duralose – UVTM Membranes – Stratagene, La Jolla, CA, EUA), sendo a transferência realizada por 90 minutos a 90 volts, no gelo.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada em solução de 3% (p/v) de albumina bovina (BSA - Sigma-Aldrich) em PBS pH 7.4 com 0,02% (v/v) de Tween 20 (PBS-T) por um período de 2 horas a temperatura ambiente e sob leve agitação. A seguir a membrana foi incubada com o anticorpo primário policlonal anti-Sm14 (produzido em coelhos New Zealand no Laboratório de Esquistossomose Experimental, Departamento de Helminologia, IOC, FIOCRUZ), diluído 1:500 ou 1:1000. A membrana foi incubada com o anticorpo primário a temperatura ambiente por um período de 16 a 18 horas (*overnight*), a seguir a membrana foi lavada duas vezes com PBS-T por cerca de 40 minutos e duas vezes com PBS pelo mesmo tempo. O anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich), foi diluído na razão 1:30.000 em PBS-T e a membrana incubada por 2 horas sob agitação leve a temperatura ambiente. A seguir procederam-se novamente as lavagens como descrito anteriormente. Após as lavagens, a membrana foi revelada com 5 mL da solução “Western Blue^R Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase” (Promega, Madison, EUA).

3.4 Padronização da multiplicidade de infecção (MOI) do BCG-P

No intuito de verificar a produção de citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α por células THP-1 induzidas por diferentes inóculos de BCG-P, as células foram infectadas numa relação de 5, 10 ou 50 UFC de BCG para cada célula THP-1. Para este ensaio foram definidos apenas dois tempos de infecção: 4 e 24 horas. Foram incubadas 1×10^6 células THP-1 com 5×10^6 , 1×10^7 ou 5×10^7 de BCG-P, em triplicata, mantidos em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB em tubos cônicos de 1,5 mL e incubadas por 4 horas, sob agitação (120 rpm) a 37°C em ambiente com 5% CO₂.

Após este período, as amostras foram centrifugadas a 400 x g e lavadas três vezes com PBS. Após a lavagem, as amostras referentes a avaliação de 4 horas de infecção foram homogeneizadas com 1 mL de meio RPMI 1640, sendo retirados 100 μ L para a recuperação dos BCGs intracelulares, e 900 μ L para avaliação da expressão de citocinas secretadas por células THP-1 infectadas com BCG pela técnica de citometria de fluxo. Já as amostras de 24 horas de infecção, foram homogeneizadas com 1 mL de meio RPMI 1640 com 10% (v/v) de SFB e incubados, sob agitação (120 rpm) a 37°C em ambiente com 5% CO₂ até o término do tempo

proposto (24 horas) sendo posteriormente processadas da mesma forma que as amostras de 4 horas.

Para o acompanhamento da viabilidade dos BCGs intracelulares, nos 100 µL retirados das amostras, foram adicionados 900 µL de tampão PBS com 0,1% (v/v) de Tween 80 (Pro Analysis, Rio de Janeiro) e centrifugados por 10 minutos a 6500 x g, para lisar as células THP-1 e obter os BCGs antes internalizados. O precipitado então foi diluído em 100 µL de meio Middlebrook 7H9 e plaqueado em meio Middlebrook 7H11 para determinação de UFC, como descrito no item 3.2.

3.5 Infecção do BCG/*sm14* e BCGs controles em células THP-1

Os experimentos envolvendo a produção de citocinas em células THP-1 infectadas com BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5) foram realizados como descrito no item 3.4, utilizando MOI de 10 micobactérias para 1 célula THP-1 nos tempos de 4, 24 e 48 horas pós-infecção. Para a análise do perfil de citocinas expressas pela célula THP-1 infectada com as diferentes amostras de BCG utilizaram-se as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo.

3.6 Avaliação da capacidade de proliferação celular da célula THP-1

Para avaliar a capacidade de replicação e a viabilidade celular das células THP-1 infectadas com BCG/*sm14* e os BCGs controles, um cultivo celular foi estabelecido por um período de 24 e 48 horas após a infecção. As células THP-1 foram infectadas com MOI de 10 micobactérias para 1 célula THP-1 como descrito no item 3.3. As amostras contendo $2,5 \times 10^5$ células THP-1 infectadas ou não com os BCGs, foram suspensas em 100 µL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB por poço em placas de 96 poços. Dezesesseis horas antes do término do tempo de infecção, foi adicionado 1µCi de timidina tritiada (Timidina-H³ - Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA) por poço e as placas foram mantidas em estufa a 37°C em ambiente com 5% CO₂. Ao término dos tempos de infecção (24h e 48h) as placas foram congeladas a -20°C até a realização da leitura.

No dia de leitura, as placas foram descongeladas a temperatura ambiente e as amostras foram transferidas através do coletor de células (Cell Harvester - Skation Instruments AS, Lier, Noruega) para o papel de filtro (FilterMAT - Skation Instruments AS). As amostras no papel de filtro foram colocadas em tubos de

cintilação sendo adicionado 1 mL por tubo de solução de cintilação [Difeniloxazol (PPO - Merck), Bis-feniloxasolilbenzeno (POPOP - Merck), Tolueno (Merck)]. As amostras foram contadas em espectrômetro de cintilação líquida (TRI-CARB® 1600 CA, Packard, Milano, Itália) e o resultado expresso em contagem por minuto (cpm).

3.7 Avaliação da estabilidade funcional (expressão do gene *kanR*) do vetor de expressão pAU5 dos BCGr

A confirmação das cepas recombinantes de BCG transformadas com os plasmídeos pAU5 e pAU5-*sm14* foi determinada através do plaqueamento de diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}), em triplicata, dos inóculos utilizados para infecção e dos BCGs recuperados das células THP-1 nos diferentes tempos de infecção (descrito no item 3.4), em meio ágar Middlebrook 7H11 suplementado com 10% (v/v) de OADC e 0,2% (v/v) de glicerol, adicionado ou não de 25 µg/mL de canamicina (Kan - Sigma-Aldrich), para a avaliação da expressão do gene *kanR* contido no vetor de expressão pAU5. As placas foram incubadas por quatro semanas para determinação de UFC em estufa a 37°C em ambiente com 5% CO₂.

3.8 Protocolo de imunocitoquímica para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1

As amostras das células THP-1 infectadas com o BCG/*sm14* e os BCGs controles foram removidas 4, 24 e 48 h após a infecção, centrifugadas a 400 x g, lavadas três vezes com PBS e mantidas em 1mL de PBS.

Utilizando uma centrífuga citológica (Citospin modelo 2400 – Fanem, São Paulo), as células foram transferidas para lâminas de microscopia (Solidor – Médico International Trading Co, Tianjin, China) previamente tratadas com 2 % (v/v) de silano (Sigma-Aldrich) em acetona PA (Merck). De cada amostra, foram adicionados 150 µL em cada orifício seguido de centrifugação a 1800 rpm por 3 minutos.

As células foram fixadas com 4% de paraformaldeído pH 7,4 (Sigma-Aldrich), por 15 minutos, e lavadas em tampão Tris base salina (TBS) com 0,2% (v/v) de Tween20 (Merck), pH 7,4 10 mM (TBS-T) por 10 minutos. A seguir, foram adicionados 50 µL de SFB diluído em TBS-T (1:100) por 30 minutos, com o objetivo de impedir ligações inespecíficas. Após a remoção do soro, foram adicionados 50 µL

dos anticorpos monoclonais primários (Tabela 3.2) diluídos em TBS-T. As lâminas foram incubadas em câmara úmida *overnight* a 4°C.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com TBS-T (3 banhos por 5 minutos cada) e incubadas com 50 µL de anticorpo secundário biotilado (Tabela 3.1). Após 30 minutos, as lâminas foram lavadas com TBS-T em três banhos por 5 minutos cada e foram adicionados 50 µL do complexo estreptoavidina-peroxidase (Dako, Glostrup, Dinamarca) por 30 minutos em câmara úmida, lavando-se em seguida três vezes por 5 minutos cada com TBS-T. Para a revelação, foram adicionados 50 µL em cada amostra da solução de 3-3' diaminobenzidina (DAB - Dako) sendo acompanhada a conversão da tonalidade em microscópio óptico (400 x). A reação foi finalizada mergulhando as lâminas em água destilada e, posteriormente, em água corrente. A seguir, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer (Dako) por 2 minutos, e posteriormente lavadas em água corrente. Logo após, as lâminas foram desidratadas em etanol (Merck) por 10 minutos, diafanizadas em xilol (Merck) por 10 minutos e montadas em “Faramount Mounting Medium, Aqueous” (Dako) entre lamínulas (Corning).

O percentual de células, expressando as citocinas IL-10, IL-12 e TNF-α após infecção com BCG/*sm14*, BCG-P ou BCG/pAU5 por 4, 24 e 48 horas foi determinado pela contagem de células positivas em um campo de duzentas células, utilizando microscopia óptica (1000x).

Tabela 3.2: Anticorpos utilizados no protocolo de imunocitoquímica

Anticorpo Primário	Origem	Diluição	Empresa	Anticorpo Secundário
anti-IL-10 humana	Rato	1:75	Mabtech AB Nacka Strand, Suécia	Coelho anti-rato (Dako)
anti-IL-12 (p70) humana	Camundongo	1:200	Mabtech AB Nacka Strand, Suécia	Kit LSAB – anti-camundongo, anti-coelho e anti-cabra (Dako)
anti-TNF-α humana	Cabra	1:25	R&D Systems Minneapolis, USA.	Kit LSAB – anti-camundongo, anti-coelho e anti-cabra (Dako)

3.9 Protocolo de citometria de fluxo para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1

Os experimentos envolvendo a produção de citocinas em células THP-1 mediada pela infecção com BCG/*sm14* e os BCGs controles foram realizados como descrito no item 3.5. Nas amostras onde a infecção ocorreu por 24 horas e 48 horas foram adicionadas 1 μ L de brefeldina A (BD Biosciences / Becton Dickinson & Company, San Diego, EUA) 4 horas antes do término de cada tempo de infecção, atuando na inibição do complexo de Golgi por este ser o principal centro de distribuição da célula, visando o acúmulo de citocina no interior da célula.

As amostras foram ressuspensas em 50 μ L da solução *Cytofix/Cytoperm* (BD Biosciences), homogeneizadas no agitador de tubos (Fanem) e incubadas por 20 minutos em gelo. Em seguida foram adicionados 150 μ L de PBS, as amostras foram centrifugadas por 10 segundos a 6500 x *g* e ressuspensas em 200 μ L tampão *Perm/Wash* 1X (BD Biosciences) adicionado com 10% (v/v) de soro AB humano (Sigma-Aldrich). Os anticorpos (Tabela 3.2) diluídos no tampão *Perm/Wash* adicionado com 10% (v/v) de soro AB humano foram adicionados as amostras e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram lavadas uma vez com 400 μ L de *Perm/Wash* e uma vez com 400 μ L PBS.

A leitura das amostras foi realizada no citômetro Coulter EPICS XL-MCL (Beckman Coulter, Fullerton, EUA), utilizando o filtro *Band Pass* (BP) de 525 nm para a leitura dos anticorpos marcados com fluorocromo Ficoeritrina (PE) e o filtro BP de 575 nm para leitura do anticorpo marcado com fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Tabela 3.3) e analisadas no programa WinMDI versão 2.8. A seleção da região de interesse (R1) foi realizada em gráficos de distribuição em pontos de tamanho celular relativo (*Foward angle light scatter* - FSC) versus granulosidade celular (*Side angle light scatter* - SSC), de onde foram excluídos tanto restos como grumos celulares, sendo analisado um mínimo de 20 mil eventos por amostra.

Tabela 3.3: Anticorpos utilizados no protocolo de citometria de fluxo

Anticorpo Primário	Origem	Diluição	Empresa	Fluorocromo	Filtros (Band Pass)
anti-IL-10 humana	Rato	1:200	BD Biosciences	PE	575 nm
anti-IL-12 (p70) humana	Camundongo	1:200	BD Biosciences	PE	575 nm
anti-TNF- α humana	Camundongo	1:800	BD Biosciences	FITC	525 nm

4. RESULTADOS

4.1 Cultivo da célula THP-1

Para a padronização da manipulação da célula THP-1 foram determinados parâmetros para o meio de cultivo e manutenção.

4.1.1 Meios de cultivo.

Foram testados, diversos meios de cultura (MEM, D-MEM e RPMI 1640) e suplementos (SFB, HEPES, L-glutamina, NaHCO_3 , 2-mercaptoetanol, piruvato de sódio, estreptomicina/penicilina, gentamicina) e após observação morfológica das células por microscopia óptica (400 x), definiu-se que para os experimentos propostos seria utilizado o meio de cultura RPMI preparado com 0,2% (v/v) de NaHCO_3 , sendo suplementado com SFB nas concentrações de 20% para o descongelamento e 10% para a manutenção e experimentos. O uso de outros suplementos de crescimento como piruvato de sódio e 2-mercaptoetanol não se mostraram necessários (dados não mostrados).

4.1.2 Manutenção

A manutenção da célula THP-1 foi realizada a cada 3-4 dias, contudo, foi estipulado após observação morfológica, que os experimentos seriam realizados com células que estivessem na terceira ou quarta passagem (Figura 4.1). Da mesma forma, para a criação dos lotes de trabalho e reposição do acervo, as células THP-1 seriam mantidas até a oitava passagem.

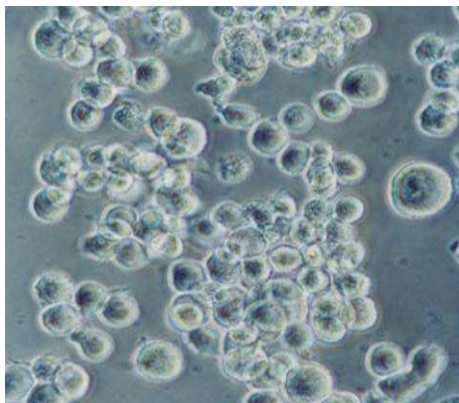


Figura 4.1 Microscopia óptica (200 x) de células THP-1, após três passagens, mantidas em meio RPMI 1640 preparado com 0,2% de NaHCO_3 e suplementado com 10% de SFB.

4.2. Cultivo das cepas de BCG

Para o cultivo das cepas BCG-P, BCG/pAU5 e BCG/sm14 foi utilizado a metodologia usualmente aplicada no LATER (Medeiros 2001, Santos 2002, Argondizzo 2005). Entretanto devido à dificuldade para a determinação da viabilidade dos BCGs em UFC utilizando o meio Middlebrook 7H10 (Difco) suplementado com 10% (v/v) de ADC preparado no laboratório, buscaram-se diferentes alternativas, como a substituição do lote do meio Middlebrook 7H10, utilização do meio Middlebrook 7H11 e suplementação dos meios com ADC e OADC comercial (Difco).

A quantificação dos BCGs obtida, em UFC, após o plaqueamento em diferentes formulações dos meios Middlebrook 7H10 e 7H11, foi confrontada com a quantificação das amostras em hemocitômetro e no ajuste ao padrão 1 do sistema de McFarland. Os resultados demonstraram que os BCGs cultivados em meio Middlebrook 7H11 preparado com 0,2% de glicerol e suplementado com 10% de OADC (Figura 4.2) obtiveram a mesma quantidade de UFC que as amostras ajustadas ao padrão 1 do sistema de McFarland e quantificadas em hemocitômetro.

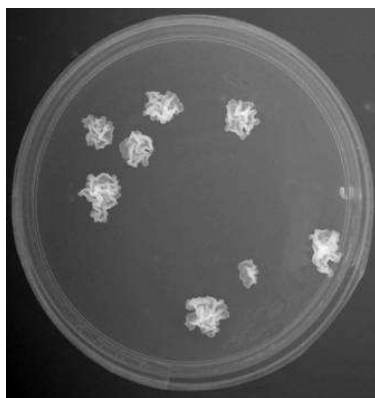


Figura 4.2 Cultura de *M. bovis* BCG Pasteur em meio 7H11 suplementado com 10% de OADC.

4.3 Expressão da proteína Sm14 pelo BCG/*sm14*

A técnica de *Western blot* foi empregada para avaliar a expressão da proteína Sm14 pelos quatro clones da construção BCG/*sm14* utilizados nos experimentos de infecção em células THP-1.

Foi utilizada como padrão (P), 20 ng da proteína Sm14r produzida em *E.coli*, gentilmente cedida pela Dr^a. Miriam Tendler (Laboratório de Esquistossomose Experimental – IOC/Fiocruz) onde em virtude do aquecimento observam-se duas bandas, referentes à proteína Sm14r e seu dímero. Nas linhas 1 a 4 foram aplicados como controle, amostras de 4 clones de BCG/pAU5, onde se observam bandas inespecíficas. Nas linhas 5 a 8 foram aplicadas amostras de 4 clones de BCG/*sm14*, destacando-se em vermelho as bandas correspondentes a proteína Sm14r produzida em BCG, sendo visualizado também o dímero dessa proteína (Figura 4.3).

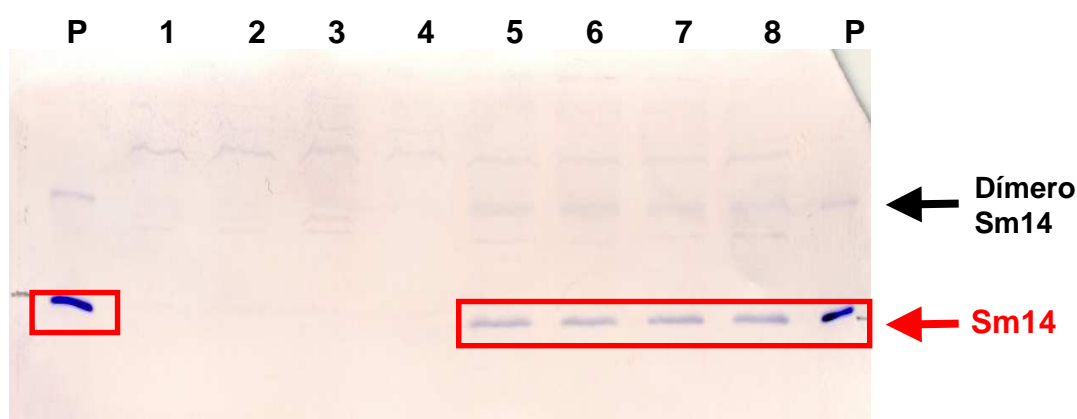


Figura 4.3 Expressão da proteína Sm14 produzida pelos quatro clones de BCG/*sm14* utilizados nos experimentos de infecção (linhas 5-8). Como controle foram usados 20 ng da proteína Sm14 (indicada pela letra P) e as proteínas totais dos quatro clones de BCG/pAU5 utilizados nos experimentos de infecção (linhas de 1-4).

4.4 Multiplicidade de infecção (MOI) BCG:THP-1

Para a determinação da melhor relação micobactéria-célula THP-1 a ser utilizada para se testar os BCG recombinantes, foi utilizada a quantificação da expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α , após 4 e 24 horas de infecção pela técnica de citometria de fluxo. Foi realizado um experimento onde foram testadas três relações micobactéria-célula THP-1: 5, 10 e 50 células de BCG-P para cada célula THP-1. Os resultados evidenciados e demonstrados na figura 4.4, indicam

que um percentual pequeno de células THP-1, mesmo sem estímulos, é capaz de secretar essas citocinas em nível basal (2,9%, 5,3%, 3,0% para IL-10, IL-12 e TNF- α , respectivamente). Estes percentuais permanecem estáveis após 4 horas de infecção com o BCG-P. Entretanto, após 24 horas de infecção com BCG-P, o percentual de células secretando IL-10 foi de 4,8%, 13,4% e 5,7% quando infectadas respectivamente por 5, 10 e 50 micobactérias-célula THP-1, indicando que para esta citocina a melhor relação micobactéria-célula THP-1 é de 10:1 (Figura 4.2). Para IL-12 foi possível observar que 4,8%; 12,7% e 6,1% das células infectadas expressavam esta citocina em resposta à mesma relação micobactéria-célula THP-1. Contudo, observamos um perfil diferente quanto à secreção de TNF- α , 10,5%, 5,97% e 4,23%, indicando que a melhor dose resposta foi obtida com a relação de 5 micobactérias-célula THP-1.

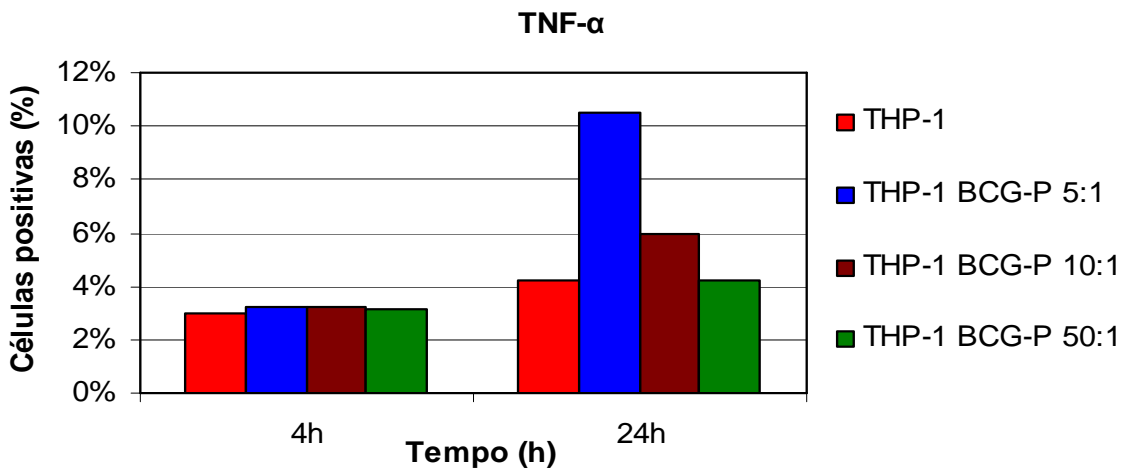
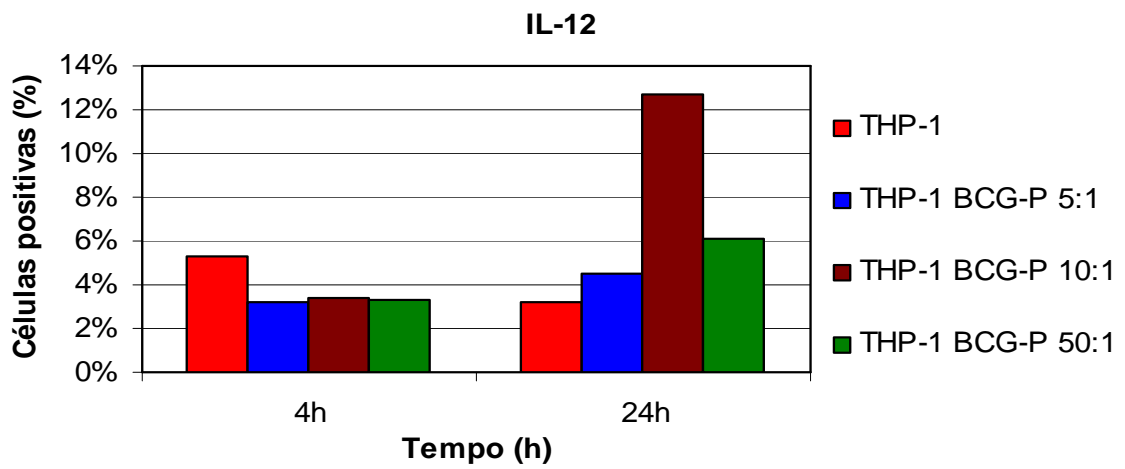
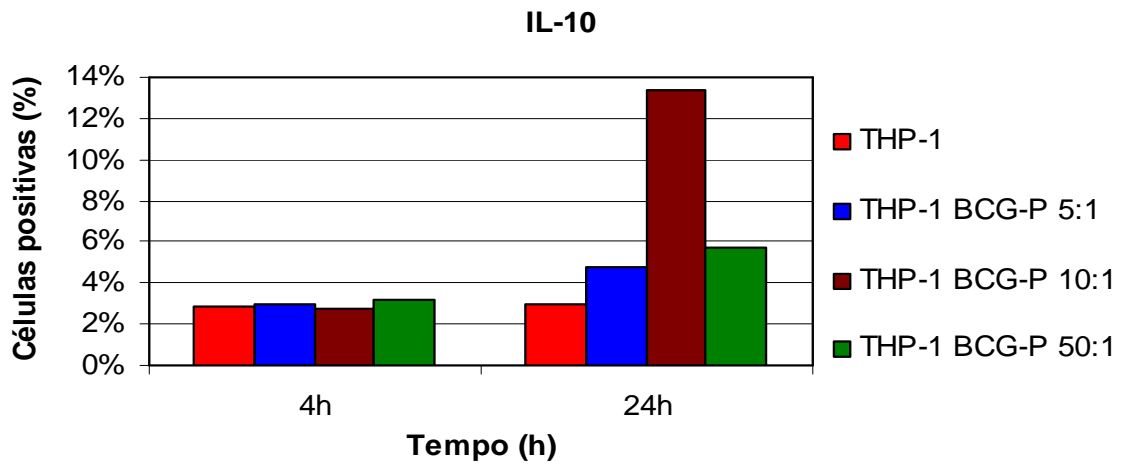


Figura 4.4. Expressão de IL-10, IL-12 e TNF- α em células THP-1 infectadas com *M. bovis* BCG sub-cepça Pasteur 1173P2 utilizando diferentes relações micobactéria-célula.

4.5 Capacidade de proliferação da célula THP-1 infectada pelo BCG/*sm14* e BCGs controles

A avaliação da capacidade de replicação das células THP-1 infectadas ou não pelo BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5) foi realizada pela técnica de proliferação celular através da absorção de timidina tritiada (cintilação). Os resultados obtidos em um experimento demonstram que as células THP-1 tiveram seu crescimento celular reduzido em mais de dois \log_{10} , 24 e 48 horas após a infecção com o BCG/*sm14* e os BCGs controles, não havendo diferença entre os BCGs. Os resultados indicam que a linhagem monocítica THP-1 tem sua diferenciação celular interrompida após infecção com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (Figura 4.5).

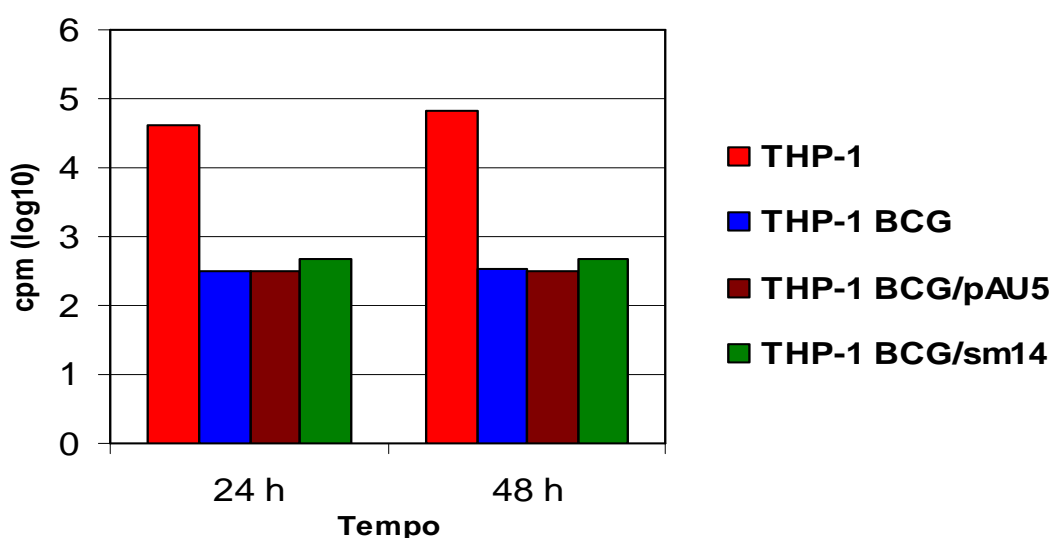


Figura 4.5: Atividade proliferativa das células THP-1 infectadas pelo BCG/*sm14* e pelos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5). Os resultados estão expressos em contagem por minuto (cpm).

4.6 Avaliação da viabilidade e estabilidade funcional (expressão do gene *kanR*) dos BCG/*sm14* e BCGs controles recuperados das células THP-1

A capacidade de infecção e manutenção do crescimento intracelular dos BCGs foi realizada em paralelo aos três experimentos de infecção com as cepas de BCG em células THP-1. A determinação comparativa das UFC dos cultivados em meio 7H11 seletivo (com canamicina – 7H11/Kan) e meio 7H11 não seletivo, permitiu avaliar a estabilidade funcional dos BCGs recombinantes (Figura 4.6).

Foi possível observar que de 3 a 7,5% dos BCGs não foram capazes de penetrar ou permanecerem aderidos a membrana das células THP-1, pois após 4 horas de infecção houve uma redução no número de bacilos utilizados para a infecção (tempo 0). Praticamente não houve diferença entre o número de bacilos recuperados entre o BCG/*sm14* e os BCGs controles, indicando que a presença do plasmídeo não alterou a capacidade dos BCGs recombinantes de penetrarem na célula.

Da mesma forma não observamos diferença entre os BCG/*sm14*, BCG-P e BCG/pAU5 quanto a capacidade de multiplicação intracelular, visto a manutenção entre o número de UFC recuperadas após 24 horas ($5,4 \log_{10}$, $5,7 \log_{10}$ e $5,4 \log_{10}$) e 48 horas ($5,3 \log_{10}$, $5,6 \log_{10}$ e $5,2 \log_{10}$). Uma redução entre 0,1 e $0,3 \log_{10}$ foi observada entre o período basal de 4 horas e após 24 e 48 horas.

Na avaliação da estabilidade funcional dos BCGs recombinantes, observamos que não houve diferença expressiva entre o cultivo dos BCG/*sm14* e BCG/pAU5 nos meios Middlebrook 7H11 e 7H11/Kan em todos os tempos avaliados. Como controle do meio seletivo, foram plaqueadas amostras de BCG, não sendo observado nenhum crescimento.

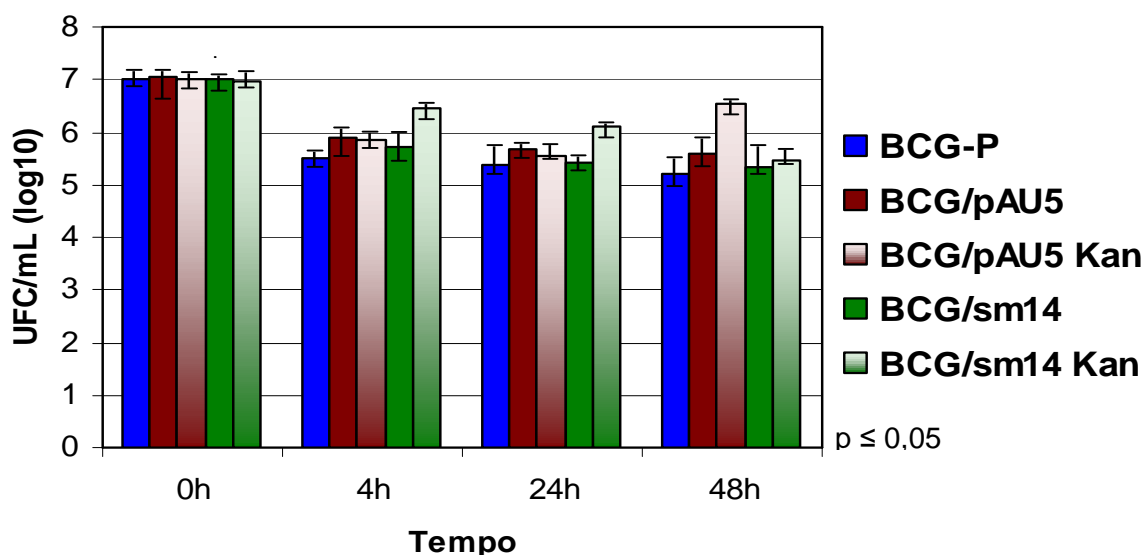


Figura 4.6 Gráfico da cinética da viabilidade do protótipo vacinal BCG/sm14 e dos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), recuperados de células THP-1 e cultivados nos meios Middlebrook 7H11 e 7H11/Kan (Três experimentos em triplicata).

4.7. Avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção do BCG/sm14 e BCGs controles em células THP-1 por imunocitoquímica

Para a detecção intracelular das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α produzidas pela infecção com BCG/sm14, BCG-P e BCG/pAU5 nas células THP-1 pela técnica de imunocitoquímica, com base na dissertação da Msc. Ana Teresa Gomes Fernandes (Fernandes 2003). Devido às dificuldades de adaptação deste procedimento à técnica de imunocitoquímica, foram avaliados diferentes parâmetros como condições de incubação dos anticorpos primários (1 hora a 25°C ou *overnight* a 4°C), tampões (HBSS, TBS-T, PBS-Saponina) e fixadores (paraformaldeído 4% ou acetona PA). Após observação morfológica por microscopia óptica (1000 x), determinou-se que os anticorpos primários deveriam ser incubados com as amostras a 4°C por 16-18 horas (*overnight*), sendo utilizado o tampão TBS-T e as amostras fixadas com paraformaldeído 4%.

Foi possível identificar por esta metodologia a produção de citocinas pelas células THP-1 (Figura 4.7). O percentual de células expressando cada citocina foi determinado após 4, 24 e 48 horas de infecção pelo BCG-P, BCG/pAU5 e BCG/sm14 através da média de três experimentos, sendo demonstrado o desvio padrão pela barra de erro. A expressão basal destas citocinas foi também determinada em células não infectadas, onde se observou que a citocina IL-10 foi

expressa por 5,0%, 10,7% e 6,4% das células THP-1, sendo que 8,8%, 8,2% e 3,4% produziram IL-12 e 3,6%, 6,5% e 2,2% expressaram TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente. Após a infecção com BCG-P, 5,9%, 6,5% e 5,5% expressavam IL-10; 9,45%, 4,6% e 6,1% expressaram IL-12 e 6,8%, 6,4% e 5,2% TNF- α , durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente. Na infecção de células THP-1 com o recombinante controle BCG/pAU5, 7,3%, 9,9% e 2,9% expressaram IL-10, na produção de IL-12 foram observados 9,9%, 8,3% e 7,1% de células e 4,1%, 5,5% e 1,5% de células produziram TNF- α . Durante a infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, foram detectadas 5,3%, 9,3% e 6,2% de células expressando IL-10; 9,4%, 10,4% e 4,3% de células produtoras de IL-12 e 4,5%; 7,1% e 6,0% de células fabricantes de TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente (Figura 4.7).

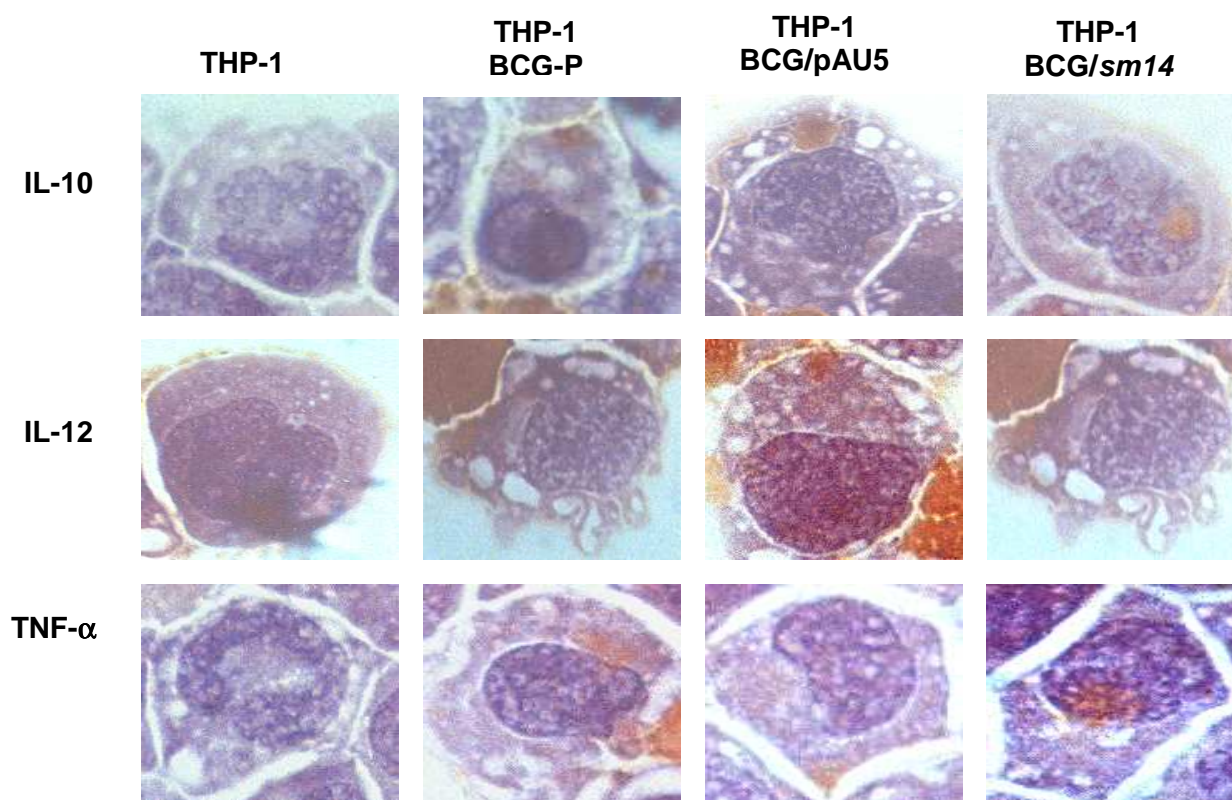


Figura 4.7 Microscopia óptica (1000 x) de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após 24 horas de infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), detectadas por imunocitoquímica.

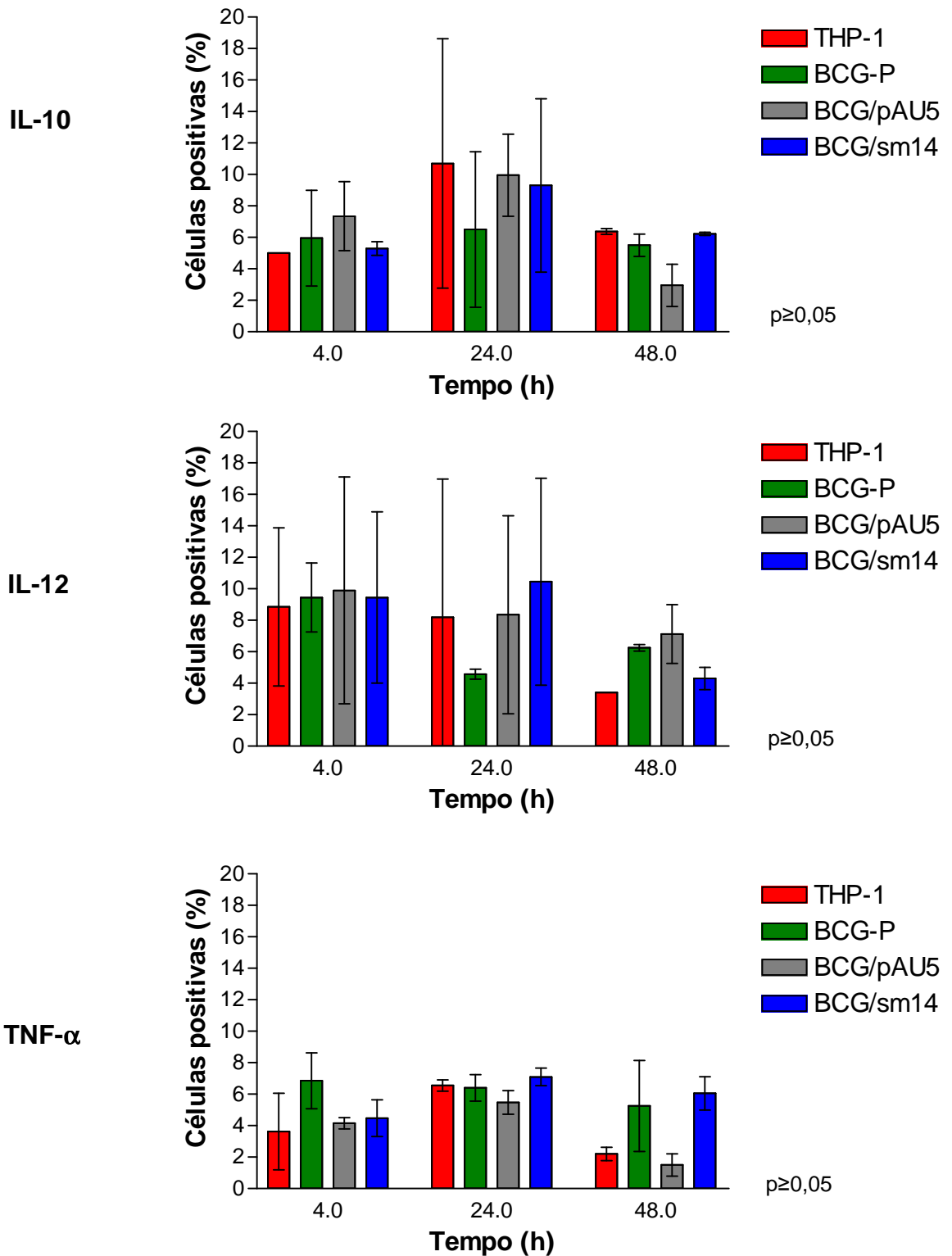


Figura 4.8 Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por imunocitoquímica (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

4.8 Avaliação das citocinas a partir da infecção do BCG/*sm14* e BCGs controles em células THP-1 por Citometria de Fluxo

Para a detecção intracelular das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α produzidas pela célula THP-1 e pela infecção com BCG/*sm14*, BCG-P ou BCG/pAU5 em células THP-1 pela técnica de citometria de fluxo, inicialmente foi determinada a região de análise a partir da leitura de uma amostra das células THP-1 incubada a 37°C em ambiente com 5% CO₂ por 4 horas, sendo comparada a relação tamanho/granulosidade, objetivando excluir tanto restos celulares quanto grumos celulares (Figura 4.8).

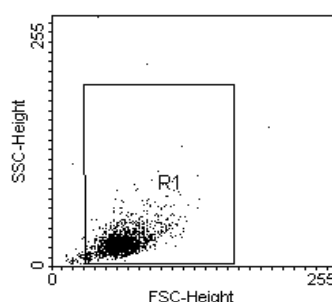


Figura 4.9 Determinação da região de análise das células THP-1 mantidas em cultivo celular. A região de análise (R1) foi determinada excluindo-se os restos celulares. Pode-se observar uma grande variabilidade quanto ao tamanho das células, visto se tratar de células em diferenciação.

Os resultados estão expressos nas figuras 4.9 a 4.12, mostrando a média de três experimentos, sendo evidenciado o desvio padrão pela barra de erro. Na detecção da produção de citocinas pelas células THP-1 sem estímulos, observou-se que a citocina IL-10 foi expressa por 3,2%, 8,1% e 11,4% das células THP-1, sendo que 2,7%, 4,6% e 8,1% das células THP-1 produziram a citocina IL-12 e 3,0%, 5,9% e 5,4% das células THP-1 expressaram TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas.

A infecção com BCG-P em células THP-1 gerou durante os tempos de infecção, 3,3%, 6,9% e 13,4% de células produtoras de IL-10; 2,0%, 5,5% e 12,0% de células expressando IL-12 e 4,2%, 5,4% e 11,4% de células sintetizando TNF- α .

Na infecção com o controle BCG/pAU5 em células THP-1, 3,3%, 6,2% e 12,3% expressaram IL-10, na produção de IL-12 foram detectados 4,3%, 4,6% e 10,2% de células e 4,0%, 3,9% e 11,3% de células produziram TNF- α .

Durante a infecção do BCG/*sm14* em células THP-1, foram detectados 3,2%, 7,9% e 12,9% de células expressando IL-10; 3,1%, 4,8% e 9,0% de células produtoras de IL-12 e 2,7%, 3,4% e 11,4% de células fabricantes de TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente.

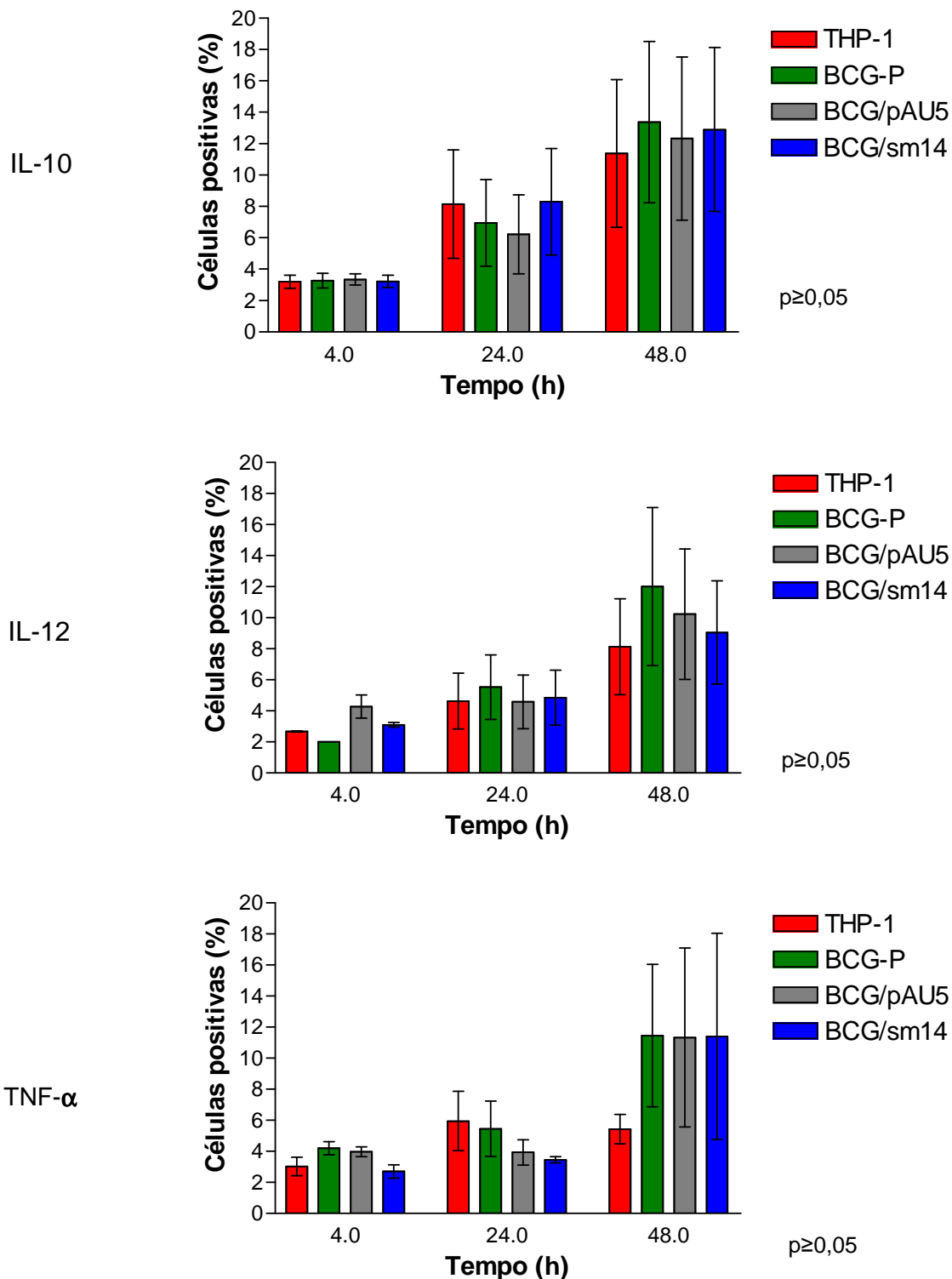


Figura 4.10: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 TNF- α e após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por citometria (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

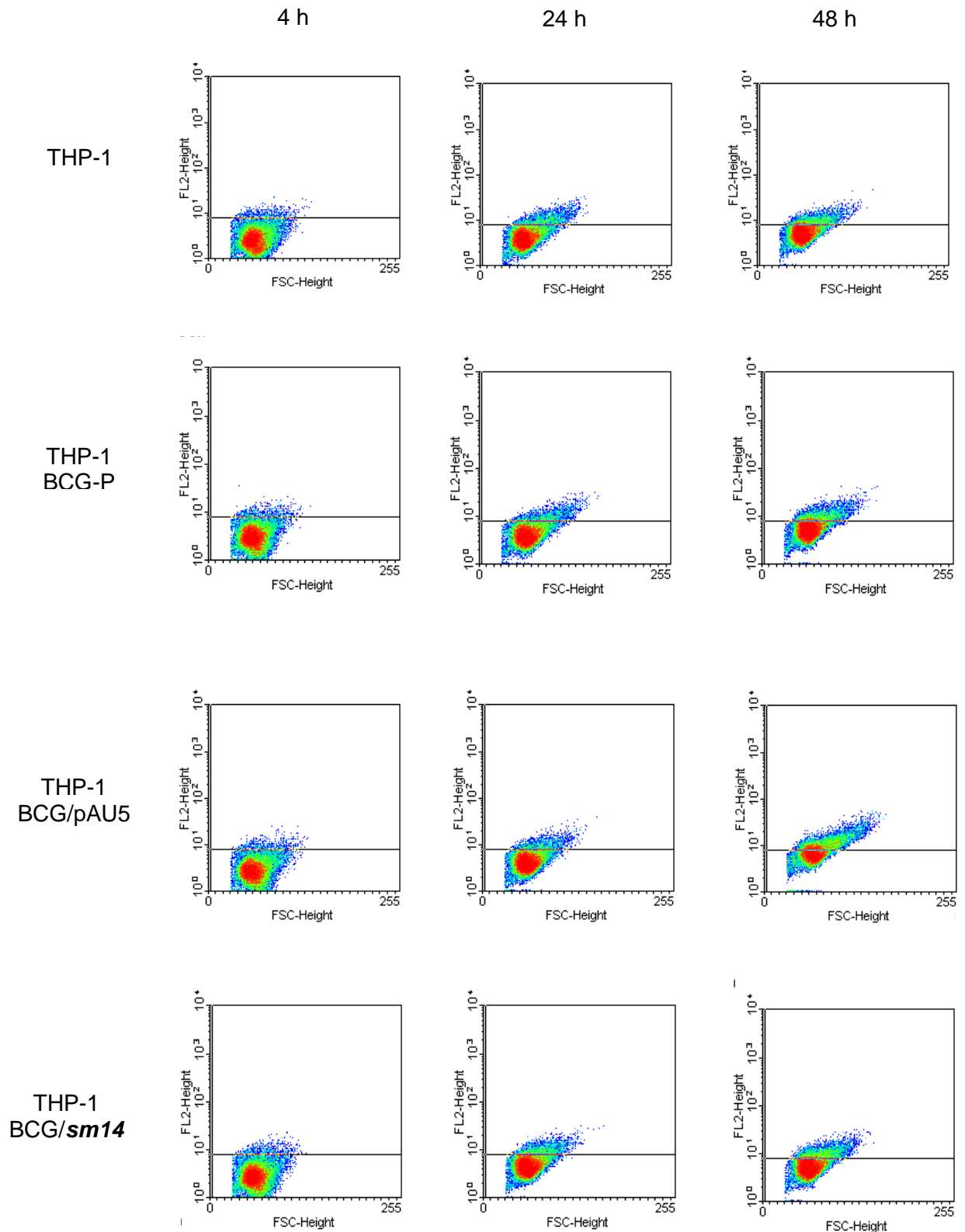


Figura 4.11: Gráfico tamanho (FSC) *versus* fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria (Experimento III).

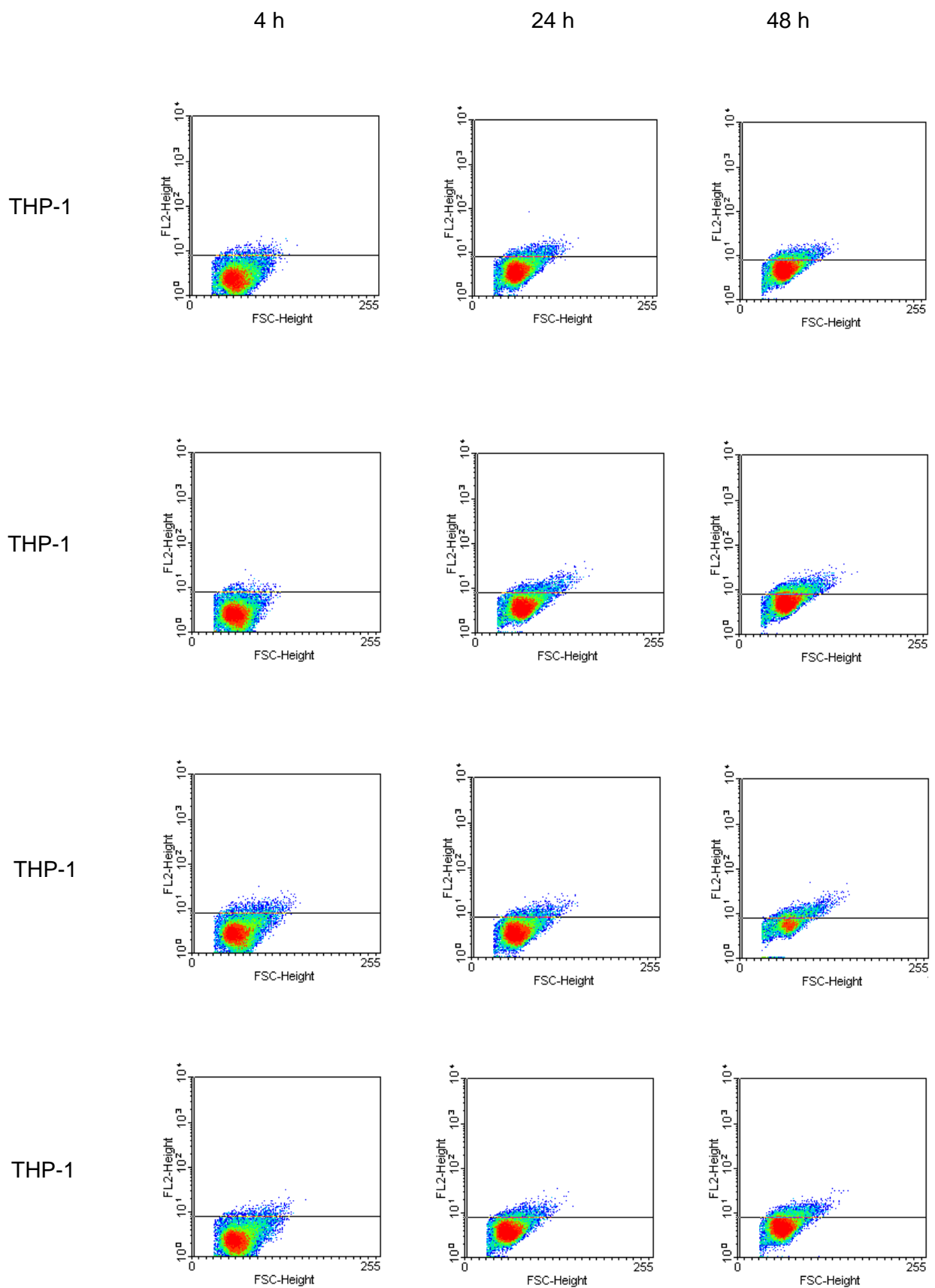


Figura 4.12: Gráfico tamanho (FSC) versus fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/sm14 e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por citometria (Experimento III).

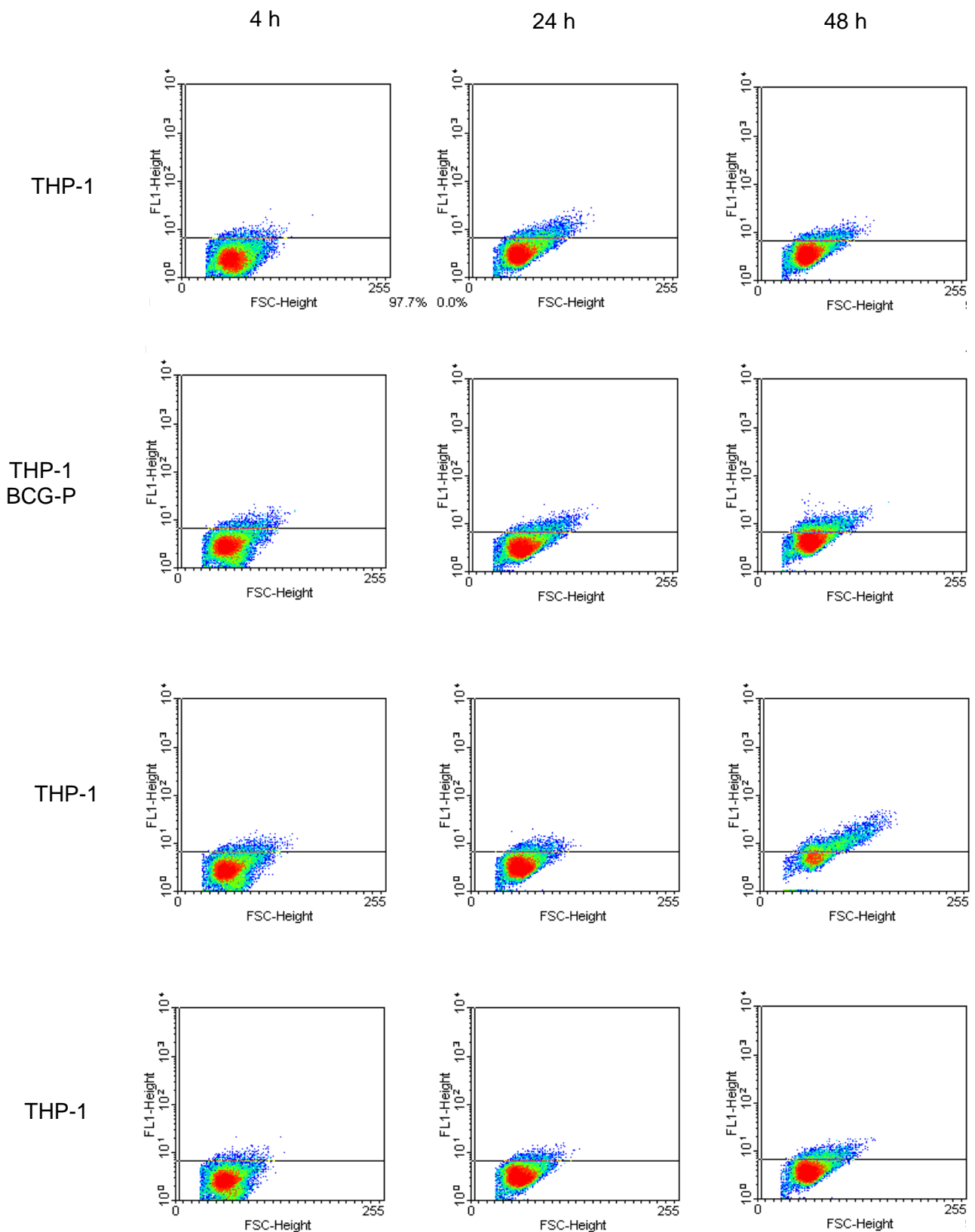


Figura 4.13: Gráfico tamanho (FSC) *versus* fluorescência (FL1 ou FL2) da avaliação de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por citometria (Experimento III).

4.9 Comparação entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo

As células THP-1 infectadas ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles foram avaliadas quanto à produção das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α durante os períodos de 4, 24 e 48 horas, pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo.

4.9.1 Detecção de IL-10

A detecção de células THP-1 produtoras de IL-10 a partir da infecção ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), estão apresentadas na figura 4.13. Nas células THP-1 não infectadas, observa-se uma variação entre 1,8% e 2,6% de células positivas na avaliação pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo nos tempos de 4 horas (5,0% e 3,2%, respectivamente) e 24 horas (8,1% e 10,7%, respectivamente), ocorrendo uma inversão na variação do número de células produtoras de IL-10, no período de 48 horas (6,4% e 11,4%, respectivamente).

Na infecção com BCG-P em células THP-1 revela-se que no período de 4 horas há variação do número de células positivas detectadas pelas duas técnicas (5,9% imunocitoquímica e 2,0% citometria). Já nos períodos de 24 e 48 horas evidencia-se uma variação de 1,0% (5,5% e 6,5%, respectivamente), sendo observado de forma similar às células THP-1 uma inversão entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (5,5% e 12,0%, respectivamente).

Na infecção com BCG/pAU5 em células THP-1 avista-se uma variação de 4,0% do número de células positivas (7,3% e 3,3%, respectivamente) em 4 horas de infecção. No tempo de 24 horas, mantém-se a variação (9,9% e 6,2% respectivamente). No entanto, no tempo de 48 horas de infecção, a porcentagem de células expressando IL-10 detectada pela técnica de imunocitoquímica diminui para 2,9% enquanto pela técnica de citometria de fluxo, aumenta praticamente quatro vezes em relação à porcentagem observada no tempo de 24 horas (12,3%).

Na infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, nos tempos de 4, 24 e 48 horas, avalia-se inicialmente uma variação de 2,1% na detecção de IL-10 pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (5,3% e 3,2%, respectivamente) no tempo de 4 horas. No tempo de 24 horas visualizamos uma pequena queda na variação dos valores obtidos entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria

(9,3% e 7,9% respectivamente). observa-se uma inversão do número de células positivas no tempo de 48 horas (6,2% e 12,9% respectivamente).

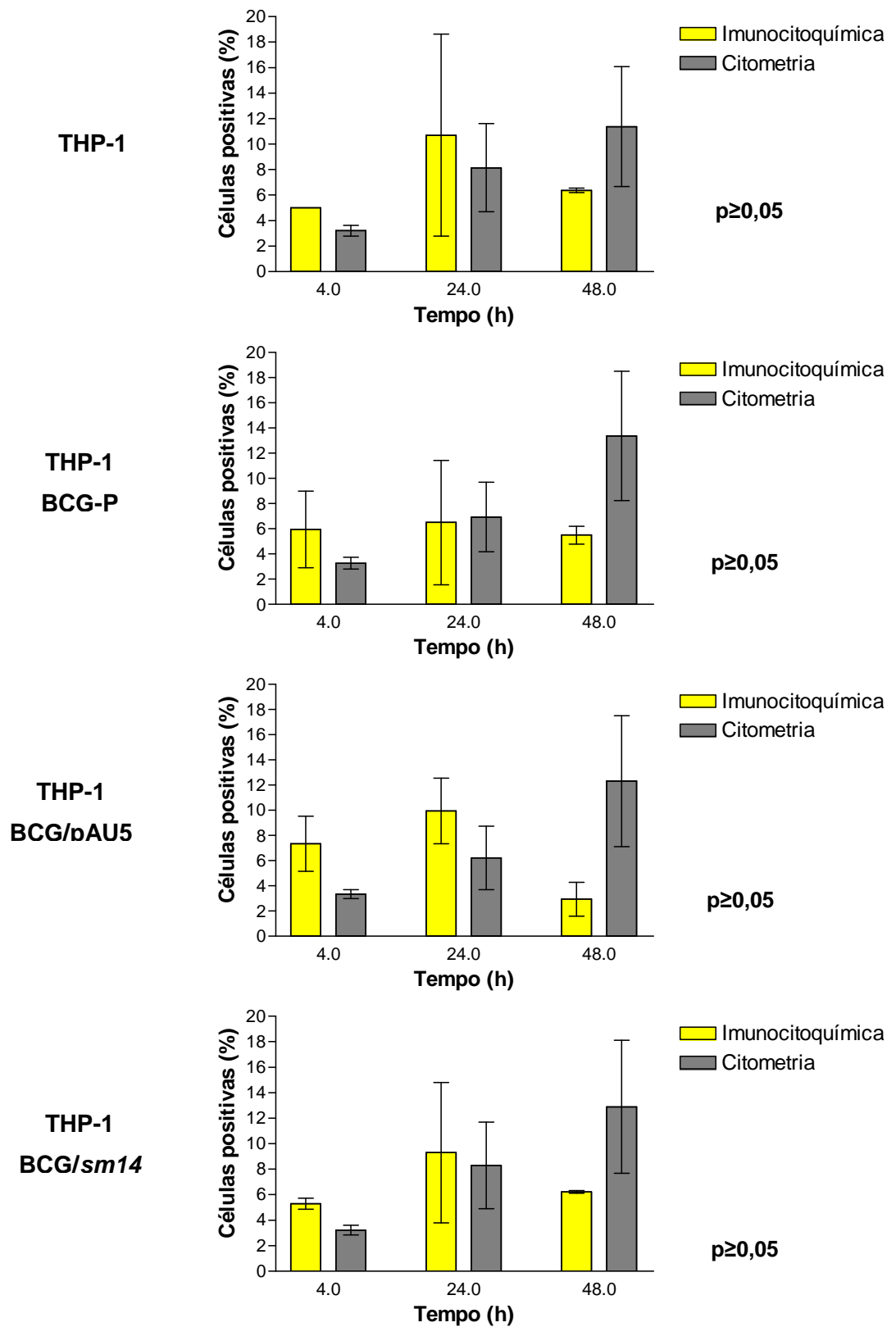


Figura 4.14: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por imunocytoquímica e citometria de fluxo (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

4.9.2 Detecção de IL-12

A detecção de células THP-1 produtoras de IL-12 a partir da infecção ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), estão apresentadas na figura 4.14. Nas células THP-1 não infectadas, observa-se uma variação na detecção de células positivas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (8,8% e 2,7%, respectivamente). No período de 24 horas, mantém-se praticamente inalterado o número de células produtoras de IL-12 avaliado pela técnica de imunocitoquímica (8,2%) e um aumento na porcentagem de células positivas avaliados pela técnica de citometria de fluxo (4,6%). No tempo de 48 horas as porcentagens de células THP-1 positivas foram de 3,4% e 8,1% nas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

Na infecção com BCG em células THP-1 revela-se que no período de 4 horas, os valores obtidos foram de 9,4% e 2,0% de células positivas identificadas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria, respectivamente. No período de 24 horas evidencia-se um decréscimo de 4,8% de células avaliadas pela técnica de imunocitoquímica (4,6%) e um aumento de 3,5% de células avaliadas pela técnica de citometria de fluxo. A mesma tendência de inversão na variação dos valores obtidos pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria no tempo de 48 horas após infecção é evidenciado (6,1% e 12,0%, respectivamente).

Na infecção com BCG/pAU5 em células THP-1 avista-se uma variação do número de células positivas detectadas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria no tempo de 4 horas (9,9% e 4,3%). Após 24 horas de infecção, ocorre uma diminuição de 1,6% do número de células positivas determinadas pela técnica de imunocitoquímica e aumento de 0,3% de células positivas avaliadas pela técnica de citometria. Já no tempo de 48 horas de infecção, a porcentagem de células expressando IL-12 detectada pela técnica de imunocitoquímica diminuiu para 7,1% e pela técnica de citometria de fluxo a porcentagem de células positivas aumentou para 10,2%.

Na infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, observa-se uma variação de mais de 6,0% na detecção de IL-12 pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (9,4% e 3,1%, respectivamente) no tempo de 4 horas. No tempo de 24 horas há um aumento de 1,0% no número de células positivas detectadas pela técnica de imunocitoquímica (10,4%) semelhante ao aumento de 1,7% detectado pela técnica de citometria de fluxo (4,8%). Em 48 horas de infecção, foram

detectados 4,3% e 9,0% de células produtoras de IL-10 pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

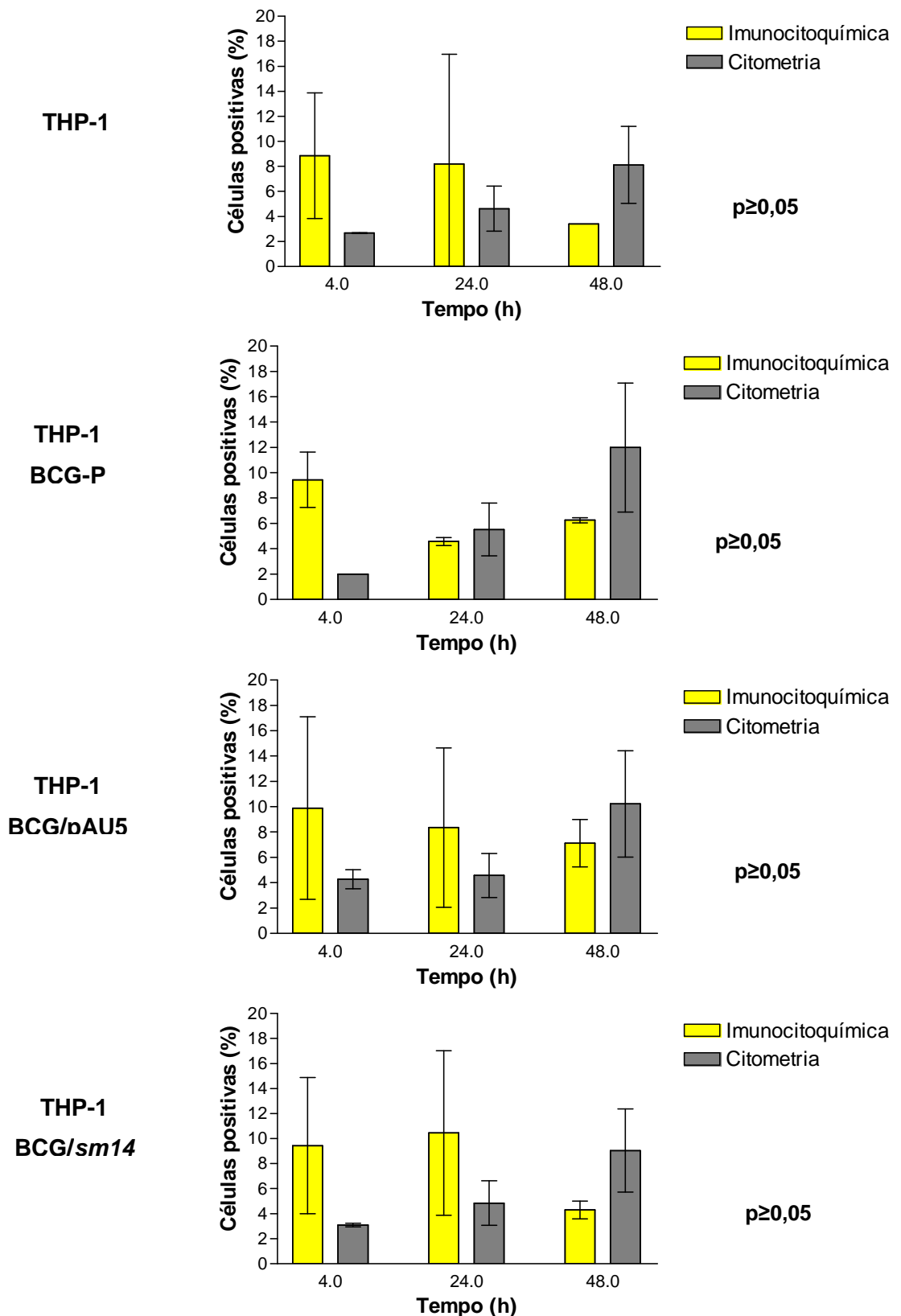


Figura 4.15: Percentagem de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

4.9.3 Detecção de TNF- α

A detecção de células THP-1 produtoras de TNF- α a partir da infecção ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), estão apresentadas na figura 4.15. Nas células THP-1 não infectadas, detecta-se no período de 4 horas os valores de 3,6% e 3,0% de células positivas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente. No tempo de 24 horas, ocorre um aumento do número de células produtoras de IL-12 avaliado tanto pela técnica de imunocitoquímica (6,5%) como pela técnica de citometria de fluxo (5,9%). No tempo de 48 horas as porcentagens de células THP-1 positivas foram de 2,2% e 5,4% nas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

Na infecção com BCG em células THP-1 revela-se que no período de 4 horas os valores detectados de células positivas pelas duas técnicas foram de 6,8% pela técnica de imunocitoquímica e 3,0% pela técnica de citometria de fluxo. Já nos períodos de 24 e 48 horas evidenciam-se 6,4% e 5,2%, respectivamente, de células positivas na leitura pela técnica de imunocitoquímica. Nesses mesmos períodos, os valores da leitura pela técnica de citometria de fluxo os valores de células produtoras de TNF- α foram semelhantes (5,9% e 5,4% respectivamente).

Na infecção com BCG/pAU5 em células THP-1 avistam-se os valores de 4,1% e 4,0% de células positivas em 4 horas de infecção pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente. No tempo de 24 horas, há um aumento do número de células expressando TNF- α detectadas pela técnica de imunocitoquímica enquanto pela citometria de fluxo o valor de células positivas mantém-se inalterado (5,5% e 3,9%, respectivamente). Já no tempo de 48 horas de infecção, a porcentagem de células expressando TNF- α detectada pela técnica de imunocitoquímica diminui para 1,5% e na técnica de citometria de fluxo aumenta consideravelmente em relação à porcentagem observada nos tempos de 4 e 24 horas (11,3%).

Na infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, nos tempos de 4, 24 e 48 horas, observa-se inicialmente os valores de 4,5% e 3,1% de células produtoras de TNF- α identificadas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo no tempo de 4 horas de infecção. No tempo de 24 horas há um aumento de células positivas detectadas em ambas as técnicas (7,1% e 4,8% respectivamente). Em 48 horas de infecção, foram detectadas 6,0% e 9,0% de células produtoras de TNF- α pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

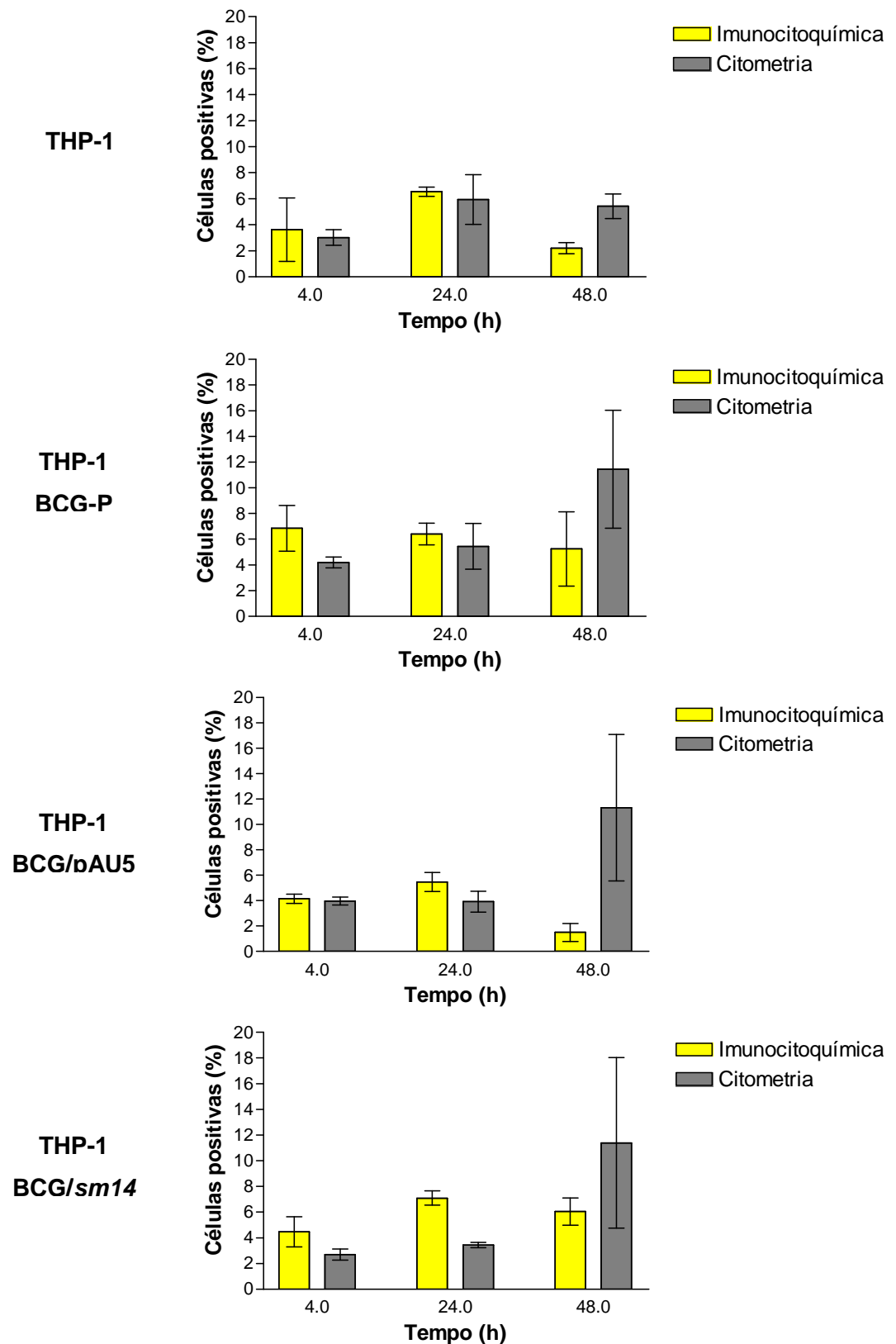


Figura 4.16: Percentagem de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

Os resultados obtidos por ambas as técnicas, apesar de divergentes entre si, não permitiram identificar diferenças no perfil de citocinas fabricadas pelas células THP-1 infectadas pelo BCG/*sm14* e pelos BCGs controles.

5. DISCUSSÃO

Devemos considerar alguns pontos importantes para se estudar a resposta imune desencadeada por protótipos vacinais, bem como sua eficácia. Dentre eles, podemos indicar a impossibilidade de se realizar experimentos em seres humanos sem prévios estudos *in vitro* em células humanas e/ou de animais e *in vivo* em animais de experimentação, apesar de sabermos que estes não reproduzem fielmente toda a gama de indução da resposta imune observado no homem (Metz *et al* 2002). Outras questões sobre o uso de animais em experimentação envolvem o benefício potencial contraposto ao sofrimento animal, aspectos legais, morais e éticos. Por estas razões um grande esforço vem sendo realizado na busca de métodos alternativos que sejam capazes de substituir, diminuir ou refinar os métodos de utilização de animais em experimentação, conforme descrito na teoria dos “3 Rs” – *Replacement* (substituição), *Refinement* (refinamento) e *Reduction* (redução) - descrita por Russell e Burch em 1959 (Dellepiane, Griffiths & Milstien 2000, Metz *et al.* 2002, Presgrave 2003).

A grande pressão internacional sobre as indústrias de fármacos, cosméticos e imunobiológicos que são grandes usuárias de animais no desenvolvimento, produção e testes de eficácia e segurança de produtos no sentido de buscarem a validação e aplicação de novas técnicas baseadas nos 3Rs, levou a criação de órgãos como o *Fund for Replacement of Animal Medical Experiments* (FRAME) que, desde 1983, edita uma revista internacional intitulada *Alternatives to Laboratory Animals* (ATLA). Em 1994, foi inaugurado o Centro Europeu para a validação de métodos alternativos (*European Centre for the Validation of Alternative Methods* - ECVAM). Outras instituições, como *Cosmetic, Toiletries and Frangrance Association* (CTFA), *Interagency Regulatory Alternatives Group* (IRAG), *Food and Drug Administration* - EUA (FDA) também atuam nos estudos de relevância e confiabilidade de propostas alternativas, pela pesquisa dos métodos atualmente utilizados e o desenvolvimento e validação de novos testes, para que os produtos químicos e os produtos de várias espécies possam ser manufaturados de forma mais segura e econômica, visando reduzir o uso e minimizar o sofrimento dos animais (Balls 2002, Hendriksen 2005).

Um dos métodos alternativos para substituição ou pelo menos diminuição do uso de animais nas fases de desenvolvimento, produção e testes de algumas vacinas é a adoção de sistemas de ensaios *in vitro*, dentre os quais podemos

destacar o uso de cultura de células (Metz *et al* 2002, Presgrave 2002, Presgrave 2003). A principal vantagem da utilização *in vitro* de cultivos celulares é o controle do ambiente de cultura, podendo-se controlar condições físico-químicas (pH, temperatura, pressão osmótica, níveis de oxigênio (O₂) e CO₂, tensão superficial) e fisiológicas (hormônios, fatores de crescimento, densidade celular), que podem ser mantidas relativamente constantes (Doyle & Griffiths 1998, Freshney 2000a). Outras vantagens relevantes são: a homogeneidade das células em cultivo em relação à morfologia e especificidades uniformes, podendo com facilidade obter um número elevado de réplicas idênticas, superando assim o problema de heterogeneidade de amostras, reduzindo a variação e o custo dos experimentos, possibilitando a realização de múltiplos testes com muitas variáveis (Doyle & Griffiths 1998, Freshney 2000a).

A técnica de cultura de células integrada com sistemas computacionais e a hierarquização de métodos podem ser ferramentas importantes para etapas do desenvolvimento de protótipos vacinais (Figura 5.1), sendo utilizada principalmente para procedimentos de seleção (*screening*) de vacinas candidatas na fase pré-clínica (Henriques & Sampaio 2002, Larsen 2005).

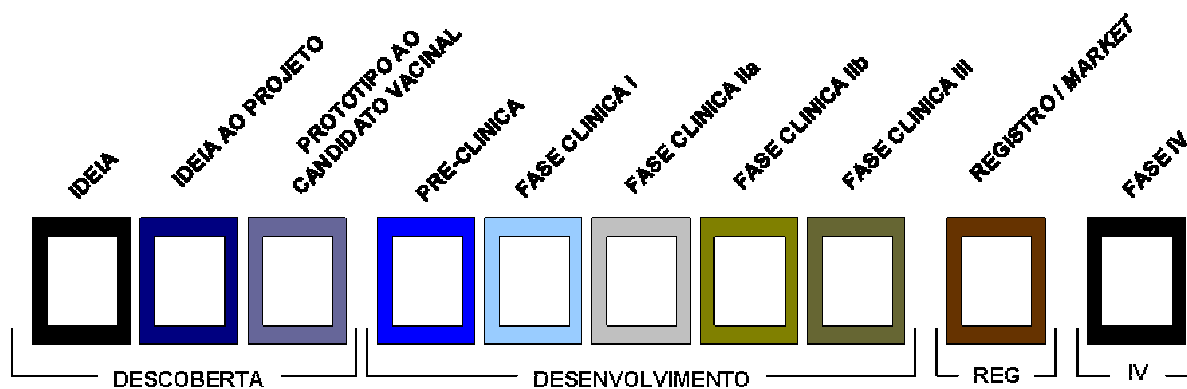


Figura 5.1: Modelo esquemático das etapas necessárias para implantação de novos fármacos e imunobiológicos (Adaptado de Larsen 2005).

Este estudo visou o desenvolvimento de um protocolo para a seleção de protótipos vacinais utilizando como modelo *M. bovis* BCG sub-cepa Pasteur expressando o antígeno Sm14 de *Schistosoma mansoni* e a linhagem de monócitos humanos THP-1 como substrato celular. Contudo, a eficiência da resposta imune induzida por BCGs recombinantes é dependente da capacidade de expressão da proteína heteróloga, uma vez que essa expressão pode interferir na

ativação celular. Assim, confirmamos a expressão da proteína Sm14 por todos os clones do protótipo vacinal BCG/*sm14*, e nossos resultados corroboram com relatos anteriores Argondizzo (2005), utilizando o mesmo sistema de expressão. Desta forma, assumimos que todos os recombinantes BCG/*sm14* estavam expressando a proteína de interesse em quantidade suficiente para o prosseguimento dos experimentos de infecção com os protótipos vacinais em linhagens monocíticas.

Para a realização dos ensaios de infecção de células THP-1 com o BCG/*sm14*, foi necessário determinar a MOI capaz de induzir a melhor dose resposta para a expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α . Assim sendo, foram avaliadas três diferentes relações, 5, 10 e 50 BCGs para cada célula THP-1. Os resultados obtidos mostram que o fato da MOI de 50 BCG:THP-1 não ter estimulado adequadamente a expressão de citocinas, sugere que esta concentração de BCG promove perda da viabilidade de células THP-1 (Hassan *et al* 2006). Por outro lado, a MOI de 10 de BCG/THP-1 estimula uma maior porcentagem de células produtoras de IL-10 e IL-12, tendo sido considerada, portanto a melhor dose-resposta para a síntese das citocinas neste estudo. Entretanto, ao contrário do observado por Oliveira, Charlab & Pessolani (2001), que na análise das MOI de 1, 10 e 100 de BCG e *M. leprae* para cada célula THP-1, concluíram que a relação de 10:1 de micobactérias-célula THP-1 induz uma maior produção de TNF- α , no presente trabalho a MOI de 5 BCGs apresentou o melhor resultado com relação às células produtoras de TNF- α . Atkinson e colaboradores (2000), realizaram de forma semelhante uma pesquisa do perfil de citocinas (IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α) expressas por linhagem primária de macrófagos humanos infectadas com MOI de 0,2, 1 e 5 BCGs, concluindo que a MOI de 5 BCG/célula induz de forma eficiente a expressão das citocinas IL-10 e TNF- α por macrófagos infectados. Devido a divergências entre os resultados obtidos neste trabalho e os resultados relatados na literatura para determinar a relação padrão para avaliação de citocinas a partir da interação BCG-macrófago, e como o maior percentual de células expressando IL-10 e IL-12 foi atingido com a relação de 10 BCG para cada célula THP-1, optamos por usar esta proporção nos ensaios de imunocitoquímica e citometria para a quantificação das células produtoras de citocinas infectadas com o protótipo vacinal BCG/*sm14*.

Dentre os requerimentos para se determinar o sucesso de protótipos vacinais está a indução e ativação das APCs, que irão realizar o processamento de antígenos, a expressão de fatores co-estimulatórios, secreção de citocinas e a

apresentação antigênica às células T, tornando-se essenciais para o desencadeamento da resposta imune (Ada 2004). Neste contexto, utilizamos uma linhagem de monócitos humanos como modelo para infecção, recuperação e análise do perfil de citocinas (IL-10, IL-12 e TNF- α) expressas em células THP-1 após infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14*. Vários autores têm utilizado esta linhagem celular como modelo de averiguação do perfil de ativação celular em monócitos (Diaz-Silvestre *et al.* 2005, Xia *et al.* 2005, Ciabattini *et al.* 2006) ou células maduras – macrófagos (Oliveira, Charlab & Pessolani 2001, Lewis *et al.* 2003, Theus, Cave & Eisenach 2004, Theus, Cave & Eisenach 2005, Hasan *et al.* 2006).

Da mesma forma, autores como Takahashi (2003), Ada (2004) e Plotkin (2005a), destacam que o reconhecimento e a ativação das APCs podem ser considerados como etapas relevantes para avaliação de protótipos vacinais e para o sucesso vacinal. Os monócitos são importantes células efetoras capazes de responder rapidamente a estímulos imunes de diferentes formas, como produção de proteínas inflamatórias, expressão de moléculas de adesão em sua superfície, ativação e diferenciação em macrófagos. Neste contexto, utilizamos a cintilografia para o acompanhamento da proliferação da célula THP-1 infectada ou não com o protótipo vacinal BCG/*sm14*, com a amostra vacinal de BCG Pasteur e com a construção BCG/pAU5. A medição de partículas beta emitidas pela timidina-H³ captada pelas células THP-1, nos permite determinar a capacidade do protótipo vacinal de ativar as células THP-1 e modificar seu estado de célula jovem, indiferenciada (monócitos) e transformá-las em células ativadas (macrófagos), a partir da redução de sua capacidade de replicação (Bennett *et al.* 1993). Nas condições avaliadas, nossos resultados mostram que as amostras de BCGs utilizadas para infectar as células THP-1 foram capazes de estimular esta linhagem, não sendo evidenciada diferenças no perfil de ativação induzido pela amostra vacinal de BCG, o protótipo vacinal BCG/*sm14* e a construção BCG/pAU5. Como a ativação dos monócitos/macrófagos não é específica, não podemos determinar o “quanto” a proteína Sm14 foi responsável pela diferenciação celular. Experimentos futuros devem ser desenhados para determinar neste sistema a capacidade de ativação da proteína Sm14.

Além da avaliação da proliferação de células THP-1, autores como Medeiros (2001), Varaldo e colaboradores (2004) e Argondizzo (2005), assinalaram a necessidade de avaliarmos a capacidade de infecção e a manutenção do

crescimento intracelular de protótipos vacinais baseados na tecnologia do BCG recombinante em culturas de monócito/macrófago. Com esse objetivo, montamos um experimento para acompanhar a cinética de crescimento do BCG/*sm14*, em paralelo com os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5) empregados na infecção e na recuperação em células THP-1, nos tempos de 4, 24 e 48 horas. Nossos dados assemelham-se com os descritos na literatura (Medeiros 2001, Varaldo *et al.* 2004, Argondizzo 2005), não detectando diferenças significativas na capacidade de infecção e de crescimento intracelular entre as amostras de BCG testadas, sendo visualizada uma pequena redução do número de UFC recuperadas entre o período basal de 4 horas e após 24 e 48 horas. Podemos concluir que nas condições estudadas o protótipo vacinal BCG/*sm14* possui a mesma aptidão de infecção e persistência intracelular da amostra vacinal BCG Pasteur e da construção BCG/pAU5, favorecendo seu uso como protótipo vacinal.

Devido à problemática da estabilidade de plasmídeos recombinantes, a qual interfere fundamentalmente com a expressão da proteína heteróloga por vacinas recombinantes baseadas em vetores vivos atenuados e, evidentemente, na plataforma do BCG recombinante (Haeseleer 1994), realizou-se a avaliação da estabilidade funcional do BCG transformado com o plasmídeo pAU5-*sm14* (BCG/*sm14*). A capacidade dos BCGs recombinantes (BCG/*sm14* e BCG/pAU5) de manterem o fenótipo de resistência para canamicina (Kan), mostra que não há diferença expressiva entre os BCGs recombinantes cultivados nos meios seletivo (7H11+Kan) e não seletivo (7H11). Esses resultados confirmam os dados obtidos no trabalho realizado por Argondizzo (2005) e são extremamente importantes para o desenvolvimento de vacinas baseada na utilização do BCG como vetor vivo atenuado de imunógenos, porque demonstram que BCGs recombinantes permanecem estáveis e expressando continuamente o gene inserido mesmo no ambiente intracelular de macrófagos (Medeiros 2001, Argondizzo 2005).

Recentemente Chabalgoity e colaboradores (2007) descrevem a importância da indução de citocinas para o desenvolvimento de uma resposta protetora para o desenho de vacinas. Visando obter dados preliminares que permitam demonstrar a viabilidade da seleção *in vitro* de vacinas, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar a possibilidade de se determinar o perfil de citocinas induzidas por protótipos vacinais em linhagem de células humanas.

As citocinas são consistentemente avaliadas e quantificadas durante testes pré-clínicos e clínicos, como marcadores de ativação e/ou supressão da resposta

imune induzida pelos protótipos vacinais. Nessa conjuntura, foi realizada a análise das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α expressas pela infecção com protótipo vacinal BCG/*sm14*, com a amostra vacinal de BCG Pasteur e com a construção BCG/pAU5 em células THP-1. Para a detecção intracelular de citocinas em células, utilizamos a técnica de imunocitoquímica (Santiago 2003) e a técnica de citometria (Kallás 1999).

A produção de citocinas induzidas pelo BCG em células mononucleares periféricas humanas segue uma cinética (Sander *et al.* 1995) que varia de indivíduo para indivíduo e tende a ser mediada por um perfil Th1 nos primeiros 5 a 7 dias, regredindo e assumindo perfil Th2 posteriormente (9 a 12 dias após a infecção). Contudo, estes autores não diferenciaram a produção de IL-10 pelos monócitos/macrófagos e linfócitos T. Mas a detecção de IL-10 foi identificada somente após 10 dias de infecção, o que contradiz nossos resultados e os de Atkinson e colaboradores (2000). Uma possível explicação pode estar na metodologia utilizada, na utilização de células não estimuladas e na obtenção destas células de indivíduos não expostos a micobactérias ou não vacinados pelo BCG. Sander e colaboradores (1995) utilizaram a técnica de imunofluorescência indireta e observação microscópica, enquanto Atkinson e colaboradores (2000) utilizaram macrófagos derivados de monócitos humanos. Em nosso sistema, a secreção de IL-10 é evidenciada em células THP-1 sem prévia ativação após 4 horas de incubação, da mesma forma após 24 horas observamos resultados similares aos descritos por Atkinson e colaboradores (2000) em macrófagos derivados de monócitos (*Monocyte-derived macrophage* – MDM). De modo interessante estes autores evidenciaram uma grande variabilidade na secreção de citocinas por MDM humanos, neste caso variando de 1,0 a 7,0% de células positivas para IL-10 após 20 horas de infecção. Observamos uma diferença entre nossos resultados obtidos pelas duas técnicas (imunocitoquímica e citometria), variando de 6,4% a 11,4%, respectivamente.

Quanto a secreção de IL-12 evidenciamos que as células THP-1 produzem, mesmo sem estímulos valores entre 2,7% e 8,8%, contudo Ciabattini e colaboradores (2006) descrevem a expressão de níveis basais de IL-12 em células mononucleares humanas (Ciabattini *et al.* 2006; 1 a 3%). O perfil de expressão de IL-12 expresso pelas células THP-1 não pode ser claramente identificado pela discrepância entre as duas metodologias utilizadas por nós, ou seja, a técnica de imunocitoquímica mostrou que 8,8% das células expressavam IL-12, enquanto que por citometria identificamos 2,7% de células positivas. Contudo após infecção pelo BCG foi observado um percentual que variou de 4,6% a 6,5% após 24 horas e 6,1 a

12,0% após 48 horas, indicando um aumento progressivo de células produtoras de IL-12. A infecção pelo BCG/sm14 também foi capaz de induzir percentuais semelhantes de células produtoras de IL-12.

Independente da metodologia utilizada, as infecções por BCG e BCG/sm14 induziram um percentual ligeiramente maior de células expressando IL-10 do que IL-12. Este perfil parece ser característico das células THP-1, e a infecção com BCG/sm14 não foi capaz de modificar esse perfil.

Uma análise mais longa, estudando a associação entre o BCG e as células THP-1 pode responder se a indução tardia destas citocinas pode ser modificada, visto não termos evidenciado esta mudança em culturas de até dois dias de interação.

Uma das maiores dificuldades para o desenvolvimento de uma vacina contra esquistossomose está a complexidade da interação entre patógeno e hospedeiro. As cercárias, os vermes adultos e os diferentes estágios de desenvolvimento entre estas formas apresentam mecanismos que permitem a estes evadir de uma resposta imune efetiva, incluindo a produção de moléculas antiinflamatórias, a inibição da migração de células apresentadoras de antígeno e a cobertura da superfície do parasito com moléculas do hospedeiro (Lebens *et al.* 2004). Outro ponto importante é o pouco entendimento da natureza da resposta imune protetora (Wynn & Hoffmann 2000, Pearce & McDonald 2002, Lebens *et al.* 2004).

Alguns autores demonstraram que em modelo murino e humano, a resposta Th2 seria eficaz para o controle da doença, ao passo que estudos de vacinação em camundongos indicam que uma imunidade mediada por células T, envolvendo a produção de IFN- γ e IL-12 (Th1), poderia ser melhor (Capron *et al.* 1995, Wynn & Hoffmann 2000). No entanto, a questão da resposta imune efetiva contra esquistossomose ainda é bastante polêmica. Existem autores que acreditam ser a resposta imune humoral a mais eficaz para a proteção de humanos e outros defendem a resposta imune celular, mas existem, também, aqueles que acreditam que ambas as respostas humoral e celular são imprescindíveis para a proteção (Brito *et al.* 2000, Ribeiro de Jesus *et al.* 2000, Varaldo *et al.* 2004). Estudos imunológicos em pessoas residentes em zonas endêmicas para esquistossomose, demonstraram altos níveis de IgE e IFN- γ , sugerindo a participação das respostas celular e humoral nos mecanismos imunológicos de resistência natural a reinfecção de *S. mansoni* (Ribeiro de Jesus *et al.* 2000). O estudo realizado por Brito e colaboradores (2000) na avaliação das respostas imunes frente à proteína Sm14 em

grupos de pessoas residentes em zonas endêmicas de esquistossomose e de pacientes crônicos e tratados para a doença, em relação à avaliação das citocinas produzidas, os níveis de IL-5 e IL-10, conhecidas como citocinas Th2, não foram estatisticamente diferentes em nenhum dos grupos estudados. Já o IFN- γ e TNF- α foram produzidos em quantidades significativamente maiores pelas PBMC de indivíduos normais endêmicos. Adicionalmente demonstraram que a IL-10 é uma importante citocina moduladora de respostas de células T na esquistossomose crônica, enquanto que a proliferação de linfócitos no grupo resistente não infectado é dependente de IFN- γ . Estes resultados sugerem que a resposta imune do tipo Th1 induzida em indivíduos normais endêmicos para um antígeno de esquistossomo poderia estar associada com resistência à infecção e também destacou a importância da Sm14 como potencial candidato vacinal contra esquistossomose humana (Brito *et al.* 2000).

Uma possível justificativa para nossos resultados seria o fato da proteína Sm14 ser expressa no citoplasma do BCG aliado a persistência intracelular BCG/*sm14* em células THP-1, não estando assim, disponível para a estimulação dos macrófagos. Nesse caso a apresentação do antígeno de interesse (Sm14) só acontece quando a Sm14 é liberada do fagossomo após a destruição do BCG (Kaufmann & Hess 1999). Dados obtidos por Varaldo e colaboradores (2004) e Argondizzo (2005), demonstram que não foram detectados anticorpos anti-Sm14 em camundongos imunizados com cepas recombinantes de BCG/*sm14*. Todavia vários autores já demonstraram, não somente a expressão de diversos antígenos no citoplasma de BCG recombinantes, como também conseguiram induzir uma eficiente resposta imune humoral, independente do sistema de apresentação no qual o antígeno alvo estava sendo expresso (Aldovini & Young 1991, Murray *et al.* 1992, Stover *et al.* 1991, Kremer *et al.* 1998, Hayward *et al.* 1999; da Cruz *et al.* 2002).

Os resultados obtidos não foram capazes de diferenciar o protótipo vacinal BCG/*sm14*, da amostra vacinal BCG Pasteur e da construção BCG/pAU5, não servindo, portanto, como comparativo aos trabalhos descritos para a determinação do perfil de citocinas obtidas nas respostas imunes contra o BCG e contra a proteína Sm14.

6. CONCLUSÕES

- Desenvolveu-se um protocolo de infecção com BCGs em células THP-1, determinando que a melhor relação foi de 10 BCGs para cada célula THP-1.
- A expressão da proteína recombinante Sm14 sintetizada pelos clones de BCG/*sm14* demonstrou-se satisfatória para realização dos experimentos de infecção em células THP-1
- O protótipo vacinal BCG/*sm14* manteve o mesmo grau de infecciosidade e persistência intracelular da sub-cepa vacinal BCG Pasteur.
- O protótipo vacinal BCG/*sm14* manteve a mesma capacidade de induzir a diferenciação e a maturação de macrófagos provenientes da linhagem de monócitos THP-1 que a sub-cepa vacinal BCG Pasteur.
- O protótipo vacinal BCG/*sm14* não foi capaz de modificar o perfil de IL-10, IL-12 e TNF- α induzido pela sub-cepa vacinal BCG Pasteur em células THP-1

7. PERSPECTIVAS

- Como a indução da resposta imune ao *Schistosoma mansoni* é preferencialmente induzida por resposta Th2 (aumento de IL-10 e diminuição de IL-12, IFN- γ e IL-2), a utilização do recombinante BCG/*sm14* como protótipo vacinal pode ser de relevância para a indução de resposta protetora para a esquistossomose, como para a tuberculose, visto que não houve diferença marcante na produção de IL-10 e/ou IL-12.
- Novos experimentos devem ser realizados para determinar o papel das células apresentadoras de antígenos na modulação de células T CD4 e CD8 visando um melhor entendimento da resposta imune adaptativa e de memória.
- A modulação das células apresentadoras de antígenos (monócitos, macrófagos, células dendríticas) pode direcionar a resposta imune a protótipos vacinais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK & Lichtman AH. **Imunologia celular e molecular**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005a. Cap.11: Citocinas. p. 251–282.

_____. **Imunologia celular e molecular**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005b. Cap.12: Imunidade inata. p. 283–306.

Ada G. The immunology of vaccination. **In:** Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines**. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2004. p. 31–46

_____. **Vaccines and vaccination**. *N Engl J Med*. 2001; 345 (14): 1042–1053

Al-Sherbiny M, Osman A, Barakat R, El Morshedy H, Bergquist R, Olds R. **In vitro cellular and humoral responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens**. *Acta Trop*. 2003; 88 (2): 117-130.

Aldovini A & Young RA. **Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-mv vaccines**. *Nature*. 1991; 351: 479–482

Amadori M, Ritelli M, Tagliabue S, Pacciarini ML. **Macrophage cell cultures for rapid isolation of intracellular bacteria: the *Mycobacterium bovis* model**. *Methods Mol Biol*. 2006; 345: 203–217

André FE. **Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises**. *Vaccine* 2003; 21: 593–595.

Argondizzo APC. **Construção do *M. bovis* BGC recombinante Sm14r e Avaliação da sua Capacidade Protetora contra Esquistossomose no Modelo Murino**. Rio de Janeiro; 2005. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] – FIOCRUZ

ATCC – *American type culture collection* **THP-1 Catalog Details: TIB-202** [online]. Manassas, EUA. 2006. [capturado em 10 de setembro de 2006]. Disponível em: <http://www.atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=TIB-202>

Atkinson S, Valadas E, Smith SM, Lukey PT, Dockrell HM. **Monocyte-derived macrophage cytokine responses induced by *M. bovis* BCG**. *Tuber Lung Dis*. 2000; 80 (4-5):197-207. Erratum in: *Tuber Lung Dis* 2000; 80 (6): 293.

Auwerx J. **The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation**. *Experimentia*. 1991; 47: 22–31.

Balls M. **Future Improvements: replacement *in vitro* methods**. *ILAR J*. 2002; 43 (Suppl): S69–S73

Bastos K.RB, Alvarez JM, Marinho CRF, Rizzo LV, D'Império Lima MR. **Macrophages from IL-12p40-deficient mice have a bias toward the M2 activation profile**. *J. Leukoc. Biol*. 2002; 71: 271–278

Bennett S, Por SB, Cooley MA, Breit SN. ***In vitro* replication dynamics of human culture-derived macrophages in a long term serum-free system**. *J Immunol*. 1993; 150 (6): 2364–2371

Berges C, Naujokat C, Tinapp S, Wieczorek H, Hoh A, Sadeghi M, Opelz G, Daniel V. **A cell line model for the differentiation of human dendritic cells.** Biochem Biophys Res Commun. 2005; 333 (3): 896–907

Beverley PCL. **Immunology of vaccination.** Br Med Bull. 2002; 62: 15-28

Bonah C. **The 'experimental stable' of the BCG vaccine: safety, efficacy, proof, and standards, 1921-1933.** Stud Hist Philos Biol Biomed Sci. 2005; 36(4): 696–721

Brito CF, Caldas IR, Coura Filho P, Correa-Oliveira R, Oliveira SC. **CD4+ T cells of schistosomiasis naturally resistant individuals living in an endemic area produce interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha in response to the recombinant 14KDA *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein.** Scand J Immunol. 2000; 51 (6): 595–601

Brusic V, August JT & Petrovsky N. **Information technologies for vaccine research.** Expert Rev Vaccines. 2005; 4 (3): 407–417

Campbell D, Mann BJ & Chadee K. **A subunit vaccine candidate region of the *Entamoeba histolytica* galactose-adherence lectin promotes interleukin-12 gene transcription and protein production in human macrophages.** Eur J Immunol. 2000; 30 (2): 423-30.

Capron A, Riveau G, Grzych JM, Boulanger D, Capron M, Pierce R. **Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomes: background and update.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 1995; 90 (2): 235–240

Carrel A. **On the permanent life of tissues outside the organism.** J. Exp. Med. 1912, 15: 516 – 528 *apud* Freshney RI. Introduction to basic principles. In: Masters JRW. **Animal cell culture: a practical approach.** 3rd ed. Oxford: Oxford University Press. 2000b: 1-18.

Chabalgoity JA, Baz A, Rial A, Grille S. **The relevance of cytokines for development of protective immunity and rational design of vaccines.** Cytokine Growth Factor Rev. 2007; 18 (1-2): 195–207

Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. **The global status of schistosomiasis and its control.** Acta Trop. 2000; 77 (1): 41–51

Ciabattini A, Cuppone AM, Pulimeno R, Iannelli F, Pozzi G, Medaglini D. **Stimulation of human monocytes with the gram-positive vaccine vector *Streptococcus gordonii*.** Clin Vaccine Immunol. 2006; 13 (9): 1037-43.

Clingan JM, Yanagawa Y, Iwabuchi K, Onoé K. **Effect of T helper 1 (Th1) / Th2 cytokine on chemokine-induced dendritic cell functions.** Cell Immunol. 2006; 242: 72–79.

Costa-Carvalho BT & Sole D. Bases Imunológicas. In: Farhat CK, Carvalho ES, Weckx LY, Carvalho LHFR, Succi RCM, org. **Imunizações: fundamentos e prática** 4^a ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2000. p. 19–36.

da Cruz FW, McBride AJA, Conceição FR, Dale JW, McFadden J, Dellagostin OA. **Expression of the B-cell and T-cell epitopes of the rabies virus nucleoprotein in *Mycobacterium bovis* BCG and induction of an humoral response in mice.** Vaccine. 2002; 20: 731–736

Dai W, Gao H, Huang H, Yuan Y, Hu J, Huangfu Y. **Comparative study on the immunogenicity between recombinant MS-Sj26GST vaccine and recombinant BCG-Sj26GST vaccine in *Schistosoma japonicum*.** J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2003, 23 (3): 213–5

Dellepiane N, Griffiths E & Milstien JB. **New challenges in assuring vaccine quality.** Bull World Health Organ. 2000; 78 (2): 155–62

Di Marzo P, Puddu P, Conti L, Belardelli F, Gesani S. **Interferon- γ up-regulates its own gene expression in mouse peritoneal macrophages.** J Exp Med. 1994; 179: 1731-1736.

Diaz-Silvestre H, Espinosa-Cueto P, Sanchez-Gonzalez A, Esparza-Ceron MA, Pereira-Suarez AL, Bernal-Fernandez G, Espitia C, Mancilla R. **The 19-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a major adhesin that binds the mannose receptor of THP-1 monocytic cells and promotes phagocytosis of mycobacteria.** Microb Pathog. 2005; 39 (3): 97–107

Doyle A & Griffiths JB. **Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology.** West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 1998. Cap.1 The cell: Selection and standardization. p. 3–52

Ellis RW. Technologies for making new vaccines. **In:** Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines.** 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2004. p. 1177–1198

Esser MT, Marchese RD, Kierstead LS, Tussey LG, Wang F, Chirmule N, Washabaugh MW. **Memory T cells and vaccines.** Vaccine. 2003, 21 (5-6): 419–430

Fantuzzi L, Puddu P, Varano B, Del Corno M, Belardelli F, Gessani S. **IFN-alpha and IL-18 exert opposite regulatory effects on the IL-12 receptor expression and IL-12-induced IFN-gamma production in mouse macrophages: novel pathways in the regulation of the inflammatory response of macrophages.** J Leukoc Biol. 2000; 68: 707-714.

FDA – *Food and drug administration.*. **Guidance for industry: Characterization and qualification of cell substrates and other biological starting materials used in the production of viral vaccines for the prevention and treatment of infectious disease.** [online]. Rockville: 2006. [capturado em 10 de janeiro de 2007]. Disponível em: <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>.

Fernandes ATG. **Identificação de células citotóxicas presentes no processo inflamatório uterino durante a co-infecção pelo vírus da imunodeficiência humana HIV e pelo vírus do papiloma humano HPV.** Rio de Janeiro. 2003. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] Fiocruz.

Freshney RI. Introduction to basic principles. In: Masters JRW, org. **Animal cell culture: a practical approach**. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press. 2000a. p. 1–18

_____. **Culture of animal cells: a manual of basic techniques**. 4th ed. New York: Wiley-Liss Inc. 2000b. Cap.1: Introduction. p. 1–8

Guermontprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. **Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells**. Annu Rev Immunol. 2002; 20: 621-67.

Haeseleer F. **Structural instability of recombinant plasmids in mycobacteria**. Res Microbiol. 1994; 145: 683–687

Harrison RG. **Observations on the living developing nerve fiber**. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1910, 140: 1905 – 7 *apud* Freshney RI. Introduction to basic principles. In: Masters JRW, org. **Animal cell culture: a practical approach**. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press. 2000b. p. 1-18.

Hasan Z, Ashraf M, Tayyebi A, Hussain R. **M. leprae inhibits apoptosis in THP-1 cells by downregulation of Bad and Bak and upregulation of Mcl-1 gene expression**. BMC Microbiol. 2006; 6: 1-9.

Hayward CMM, O'Gaora P, Young DB, Griffin GE, Thole J, Hirst TR, Castello-Branco LR, Lewis DJM. **Construction and murine immunogenicity of recombinant Bacille Calmette Guérin vaccines expressing the B subunit of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin**. Vaccine. 1999, 17: 1272–1281.

Hendriksen CFM. **Laboratory animals and immunization procedures: challenges and opportunities**. ILIAR J. 2005; 46 (3): 227–229.

Henriques MGMO & Sampaio ALF. Alternativas para animais de laboratório: sistemas *in vitro*. In: Andrade A, Pinto SC & Oliveira RS, org. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002: 337–344

Kallás EG. **Detecção da produção antígeno-específica de IFN γ e IL-4 por linfócitos T de sangue periférico após infecção e vacinação**. São Paulo 1999. Doutorado [Escola Paulista de Medicina] Universidade Federal de São Paulo

Kaufmann SHE & Flynn JL. CD8 T cells in tuberculosis. In: Cole ST, Eisenach D, McMurray DN, Jacobs Jr WR, org. **Tuberculosis and the tubercle bacillus**. Washington: ASM Press. 2005. p. 155–164.

Kaufmann SH & Hess J. **Impact of intracellular location of and antigen display by intracellular bacteria: implications for vaccine development**. Immunol Lett. 1999; 65 (1-2): 81–4

Kidd P. **Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease**. Altern Med Rev. 2003; 8 (3): 223-246.

Kremer L, Dupre L, Riveau G, Capron A, Loch C. **Systemic and mucosal immune responses after intranasal administration of recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin expressing glutathione S-transferase from *Schistosoma haematobium*.** Infect Immun. 1998; 66 (12): 5669-5676.

Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, Graeber TG, Sieling PA, Liu YJ, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. **TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells.** Nat Med. 2005, 11 (6): 653–660

Laemmli UK. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature. 1970, 227: 680-685

Larsen NG. **Drug and Device Development Guide.** Copenhagen: Medicon Valley Academy. 2005. Cap. 1: Development – definition, costs and time. p. 9-13

Lebens M, Su J, Czerkinsky C, Holmgren J. **Current status and future prospects for a vaccine against schistosomiasis.** Expert Rev Vaccines. 2004; 3 (3): 315-328.

Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, Sherman DR. **Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation.** J Infect Dis. 2003; 187 (1): 117–123

MacCullough KC & Summerfield A. **Basic concepts of immune response and defense development.** ILAR J. 2005; 46 (3): 230–240.

Mantovani A, Sica A & Locati M. **Macrophage polarization comes of age.** Immunity. 2005; 23 (4): 344 – 346

MacFarland J. **Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines.** J Am Med Assoc. 1907; 14: 1176-1178

Medeiros MA. **Desenvolvimento do *Mycobacterium bovis* BCG como sistema de expressão de antígeno vacinal de *Bordetella pertussis*.** Pelotas; 2001. Doutorado – Universidade Federal de Pelotas.

Medeiros MA, Armoa GR, Dellagostin AO, McIntosh D. **Induction of humoral immunity in response to immunization with recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the S1 subunit of *Bordetella pertussis* toxin.** Can. J. Microbiol. 2005; 51 (12): 1015 - 20.

Metz B, Hendriksen CFM, Jiskoot W, Kersten GFA. **Reduction of animal use in vaccine quality control: opportunities and problems.** Vaccine. 2002, 20: 2411 – 2430

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Annette MH. **M1/M2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm.** J Immunol. 2000; 164: 6166-6173.

Misumi S, Endo M, Mukai R, Tachibana K, Umeda M, Honda T, Takamune N, Shoji S. **A novel cyclic peptide immunization strategy for preventing HIV-1/AIDS infection and progression.** J Biol Chem. 2003; 278 (34): 32335-43.

- Mosmann TR. **Cytokines: is there biological meaning?** Curr. Opin Immunol. 1991, 3: 311-314
- Mosmann TR & Coffman RL. **Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells.** Adv. Immunol. 1989, 46: 111-147
- Murray A, Winter N, Lagranderie M, Hill DF, Rauzier J, Timm J, Leclerc C, Moriaty KM, Gheorghiu M, Gicquel B. **Expression of *Escherichia coli* beta-galactosidase in *Mycobacterium bovis* BCG using an expression system isolated from *Mycobacterium paratuberculosis* which induced humoral and cellular immune responses.** Mol Microbiol. 1992, 6 (22): 3331-3342.
- NIAID - *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*. **Understand vaccines: What they are / How they work.** Washington: NIH publication, 2003. 55 pp.
- Ohara N & Yamada T. **Recombinant BCG vaccines.** Vaccine. 2001, 19: 4089–4098
- Oliveira MM, Charlab R, Pessolani MC. ***Mycobacterium bovis* BCG but not *Mycobacterium leprae* induces TNF-alpha secretion in human monocytic THP-1 cells.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96 (7): 973-978.
- Parlow TG. A resposta imunológica. In: Parlow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB, org. **Imunologia médica.** 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004. p. 52-60.
- Pearce EJ & McDonald AS. **The immunobiology of schistosomiasis.** Nat Rev Immunol. 2002; 2 (7):499-511.
- Plotkin SA. **Six revolutions in vaccinology.** Pediatr Infect Dis J. 2005a, 24 (1): 1–9
- _____. **Vaccines: past, present and future.** Nat Med. 2005b, 11 (4 Suppl): S5-S11.
- Plotkin SL & Plotkin SA. A short history of vaccination. In: Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines.** 4th ed. Philadelphia: Saunders, 2004: 1-12
- Presgrave OAF. **Teste de liberação de citocinas como método alternativo ao ensaio de pirogênio em coelhos no controle da qualidade de produtos injetáveis.** Rio de Janeiro; 2003. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] - Fundação Oswaldo Cruz
- Presgrave OAF. Alternativas para animais de laboratório: do animal ao computador. In: Andrade A, Pinto SC & Oliveira RS, org. **Animais de laboratório: criação e experimentação.** Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002. p. 361–368
- Rappuoli R. **From Pasteur to genomics: progress and challenges in infectious diseases.** Nat Med. 2004, 10 (11): 1177–1185
- Reis e Sousa C. **Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity.** Curr Opin Immunol. 2004a, 16 (1): 21–5

_____. **Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls.** *Semin Immunol.* 2004b, 16 (1): 27–34

Rezende CA, De Moraes MT, de Souza Matos DC, McIntoch D, Armoa GR. **Humoral response and genetic stability of recombinant BCG expressing hepatitis B surface antigens.** *J Virol Methods* 2005; 125 (1): 1–9.

Ribeiro de Jesus A, Araújo I, Bacellar O, Magalhães A, Pearce E, Harn D, Strand M, Carvalho EM. **Human immune responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens.** *Infect Immun.* 2000; 68 (5): 2797–803

Ritelli M, Amadori M, Tagliabue S, Pacciarini ML. **Use of a macrophage cell line for rapid detection of *Mycobacterium bovis* in diagnostic samples.** *Vet Microbiol.* 2003; 94: 105-120.

Rosenthal KS & Zimmerman DH. **Vaccines: All things considered.** *Clin Vaccine Immunol.* 2006; 13 (8): 821-829

Russell WMS. & Burch RL. **The Principles of Humane Experimental Technique.** London: Methuen. Smyth, D. 1959. 238 pp.

Saalmüller A. **New understanding of immunological mechanisms.** *Vet Microbiol.* 2006; 117 (1): 32-8.

Sander B. Skansén-Saphir, Damm O, Hakansson L, Andersson J, Andersson U. **Sequential production of Th1 and Th2 cytokines in response to live bacillus Calmette-Guerin.** *Immunology.* 1995, 86 (4): 512–8

Santiago ACC. **Correlação entre a colonização pelos isolados clínicos de *Mycobacterium avium* e a imunidade celular específica a antígenos micobacterianos em pacientes HIV-1 positivos.** Rio de Janeiro 2003. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] FIOCRUZ.

Santos JPS. **Avaliação da estabilidade estrutural e funcional de vetores plasmidiais recombinantes bifuncionais (*Escherichia coli* – *Mycobacterium*) em *Mycobacterium bovis* BCG.** Rio de Janeiro; 2002. Mestrado [Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes] – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Serruto D & Rappuoli R. **Post-genomic vaccine development.** *FEBS Lett.* 2006, 580: 2985–2992.

SLIPE – Sociedade Latinoamericana de Infectologia Pediátrica & API – Associação Panamericana de Infectologia. **Manual de Vacinas da América Latina.** Madrid: Euro RSCG Life Esquema, 2005. 620 pp.

Smith KC & Starke JR. Bacille Calmette-Guérin vaccine. **In:** Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines.** 4ª ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2004 p. 179–210

Smith SG, Patel PM, Selby PJ, Jackson AM. **The response of human dendritic cells to recombinant adenovirus, recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus**

Calmette Guerin and biolistic methods of antigen delivery: different induction of contact-dependant and soluble signals. Immunol Lett. 2001; 76 (2): 79-88.

Standiford TJ. **Anti-inflammatory cytokines and cytokine antagonists.** Curr Pharm Des. 2000, 6 (6): 633-49.

Stokes RW & Doxsee D. **The receptor-mediated uptake, survival, replication, and drug sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* within the Macrophage-like cell line THP-1: A comparison with human monocyte-derived macrophages.** Cell Immunol. 1999; 197: 1-9

Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, Bennett LT, Bansal GP, Young JF, Lee MH, Hatfull GF, Snapper SR, Barletta RG, Jacobs WR, Bloom RR. **New use of BCG for recombinant vaccines.** Nature. 1991, 351: 456-460.

Takahashi H. **Antigen presentation in vaccine development.** Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2003, 26 (5-6): 309–28

Tendler M, Brito CA, Vilar MM, Serra-Freire N, Diogo CM, Almeida MS, Delbem ACB, Silva JF, Savino W, Garrat RC, Katz N, Simpson AJG. **A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine.** Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93: 269–273

Theus SA, Cave MD & Eisenach KD. **Activated THP-1 cells: an attractive model for the assessment of intracellular growth rates of *Mycobacterium tuberculosis* isolates.** Infect Immun. 2004; 72(2): 1169-1173

_____. **Intracellular macrophage growth rates and cytokine profiles of *Mycobacterium tuberculosis* strains with different transmission dynamics.** Infect Dis. 2005; 191 (3): 453–60

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. **Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1).** Int. J. Cancer. 1980; 26: 171-176

Varaldo PB, Leite LCC, Dias WO, Miyaji EN, Torres FIG, Gebara VC, Armôa GRG, Campos AS, Matos DCS, Winter N, Gicquel B, Vilar MM, McFadden J, Almeida MS, Tendler M, McIntosh D. **Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* protects mice from cercarial challenge.** Infect Immun. 2004; 72(6): 3336-3343

Varaldo PB, Miyaji EN, Vilar MM, Campos AS, Dias WO, Armôa GRG, Tendler M, Leite LCC, McIntosh D. **Mycobacterial codon optimization of the gene encoding the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* in recombinant *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin enhances protein expression but not protection against cercarial challenge in mice.** FEMS Immunol Med Microbiol. 2006, 48 (1): 132-139.

Wack A & Rappuoli R. **Vaccinology at the beginning of the 21st century.** Curr Opin Immunol. 2005, 17 (4): 411– 418

WHO. *World health organization*. **TDR Progress: New and Improved Tools - New candidates in development: vaccine development schistosomiasis**. Geneva: 2000. [capturado em 16 de outubro de 2004]. Disponível em: <http://who.int/tdr/research/progress9900/tools/vaccine-schistossomiasis.htm>.

_____. **Global Plan to stop tuberculosis 2006-2015**. Geneva: WHO Press. 2006: 1-17

Wynn TA & Hoffmann KF. **Defining a schistosomiasis vaccination strategy – it is really Th1 versus Th2?** *Parasitol Today*. 2000; 16, (11): 497–501.

Xia HH, Lam SK, Chan AO, Lin MC, Kung HF, Ogura K, Berg DE, Wong BC. **Macrophage migration inhibitory factor stimulated by *Helicobacter pylori* increases proliferation of gastric epithelial cells**. *World J Gastroenterol*. 2005, 11 (13): 1946–1950

Xing Z, Zganiacz A & Santosuosso M. **Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF-alpha and nitric oxide from macrophages via IFN-gamma induction**. *J Leukoc Biol*. 2000; 68: 897-902.

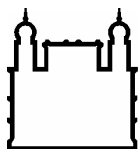
Zhao G, Etherton TD, Martin KR, Vanden Heuvel JP, Gillies PJ, West SG, Kris-Etherton PM. **Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells**. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 336 (3): 909–917.

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE AVALIAÇÃO DE
PROTÓTIPOS VACINAIS EM LINHAGEM DE MONÓCITO HUMANA
(THP-1)**

DANILO PARMERA

RIO DE JANEIRO
2007



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

DANILO PARMERA

**Desenvolvimento de um modelo de avaliação de protótipos
vacinais em linhagem de monócito humana (THP-1)**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos

RIO DE JANEIRO

2007

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas / ICICT / FIOCRUZ - RJ

P253 Parmera, Danilo

Desenvolvimento de um modelo de avaliação de protótipos vacinais em
linhagem de monócito humana (THP-1) / Danilo Parmera. – Rio de Janeiro,
2007.

xiii, 64 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos,
Tecnologia em Imunobiológicos, 2007.

Bibliografia: f. 56-64.

1. THP-1. 2. Vacina BCG. 3. Sm-14. 4. Vacina – Protótipo. 5. Citocinas.
I. Título.

CDD: 615.372

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico, Laboratório de Tecnologia Recombinate e no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Departamento de Micro-Imuno e Parasitologia, Serviço de Imunologia, Laboratório de Imunologia Celular, sob a orientação do Prof. Dr. Geraldo Rodrigues Garcia Armoa e Prof Dra. Maria da Glória Bonecini de Almeida.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

DANILO PARMERA

**Desenvolvimento de um modelo de avaliação de protótipos
vacinais em linhagem de monócito humana (THP-1)**

ORIENTADORES: Prof. Dr. Geraldo Rodrigues Garcia Armôa
Profª. Drª. Maria da Glória Bonecini de Almeida

Examinadores:

Prof. Dr. Douglas McIntosh – Bio-Manguinhos – Presidente

Profª. Drª. Cynthia Silveira Horn – IPEC/FIOCRUZ

Prof. Dr. Walter Martin Roland Oelemann – IMPPG/UFRJ

Rio de Janeiro

Dedico esta Dissertação a Deus,

pele dom da vida.

a minha família

pele carinho e apoio na minha trajetória,

à minha noiva, Fernanda,

pele amor.

AGRADECIMENTOS

À FIOCRUZ, em nome de seu presidente Dr. Paulo Marchiori Buss, por proporcionar a excelência na produção de fármacos e imunobiológicos e no desenvolvimento científico de nosso país.

À Bio-Manguinhos, em nome do seu diretor Dr. Akira Homma, pela oportunidade e condições propiciadas à realização de uma pós-graduação profissional.

Ao IPEC, em nome da sua diretora Dra. Valdiléa Gonçalves Veloso, pelas condições propiciadas à realização da minha dissertação.

Ao orientador e amigo Prof. Dr. Geraldo Rodrigues Garcia Armôa por acreditar no meu potencial, pelos valorosos ensinamentos, apoio incondicional e incentivo aos trabalhos realizados.

À orientadora e amiga Prof^a. Dr^a. Maria da Glória Bonecini de Almeida pelas portas abertas de seu laboratório, possibilitando a execução deste trabalho e pela sincera atenção com que sempre me recebeu e pelo exemplo de pesquisadora.

Aos Professores, Coordenadora e Secretária do MPTI, que muito contribuíram na minha valorização humana e aos meios acadêmicos para ingresso, manutenção e término do curso.

À Dr^a. Cynthia Silveira Horn, pelas importantes contribuições durante a realização deste trabalho, em especial o experimento de proliferação celular.

Ao Dr. Douglas MacIntosh, pelas importantes contribuições durante a realização deste trabalho, em especial no auxílio na realização dos ensaios de *western blotting*, no cultivo das amostras de BCG e na revisão deste manuscrito.

Aos amigos Ana Paula Argondizzo, João Pedro Souza Santos, Gabriela dos Santos Esteves, Dilzamar Velloso do Nascimento, Dr. José Procópio Senna, Dr. Marco Antônio Medeiros, Natália Plínio dos Santos, Dra. Elezer Monte Blanco Lemes, Camilla Bayma, Dra. Ana Carolina Góes pelo companheirismo, amizade, solidariedade e apoio pessoal e profissional.

À amiga Maria Luiza Azevedo pela amizade, eficiência, disponibilidade de auxílio em todos os momentos e palavras reconfortantes nos momentos de desespero.

À doutoranda e amiga Ana Teresa Fernandes pela alegria e disposição no auxílio dos experimentos de imunocitoquímica

Aos tecnologistas e amigos Andréia Lamoglia e Márcio Mantuano pelo auxílio na realização dos experimentos realizados no citômetro de fluxo.

À amiga Larissa Catharina Costa pela colaboração e dedicação nos experimentos infinitos e pelos momentos divertidos no laboratório.

Ao amigo Dyego Carletti pelo auxílio no experimento de proliferação celular.

Aos colaboradores e amigos do Serviço de Imunologia, Dra. Liane Castro, Carla Bial, Márcia Andrade, Millena Rosalba, Ana Cristina Santiago Leandro, Marcelo Leandro, Leonardo Gatto, Silvia Silva, Regina Pimenta, Maristela Lima, Monique Lima e a equipe do laboratório de Imunodiagnóstico pelo companheirismo e apoio.

Aos companheiros do Mestrado Profissional, no qual dividimos boa parte de nossas manhãs, pela cooperação e companheirismo.

Aos parentes e amigos pelos momentos de descontração, conversas, apoio, amizade, alegrias e tristezas compartilhadas. (por serem muitos não serão citados, mas estarão sempre em minha memória)

A todas as pessoas que não foram nominalmente mencionadas, mas que contribuíram para viabilizar este trabalho.

E, finalmente, a Deus, que proporcionou a mim e a minha família os meios possíveis para alcançar a felicidade.

"ESPERE O MELHOR, PREPARE-SE PARA O PIOR E ACEITE O QUE VIER."

Provérbio Chinês

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	lx
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3. METODOLOGIA.....	15
3.1 Cultivo da célula THP-1.....	15
3.2. Cultivo das cepas de BCG.....	16
3.3 Avaliação da expressão da proteína recombinante Sm14 em BCG/ <i>sm14</i>	17
3.4 Padronização da multiplicidade de infecção (MOI) do BCG-P.....	18
3.5 Infecção com BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles em células THP-1.....	19
3.6 Avaliação da capacidade de proliferação celular da célula THP-1.....	19
3.7 Avaliação da estabilidade funcional (expressão do gene <i>kanR</i>) do vetor de expressão pAU5 dos BCGr.....	20
3.8 Protocolo de imunocitoquímica para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1.....	20
3.9 Protocolo de citometria de fluxo para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1.....	22
4. RESULTADOS.....	24
4.1 Cultivo da célula THP-1.....	24
4.1.1 Meios de cultivo.....	24
4.1.2 Manutenção.....	24
4.2. Cultivo das cepas de BCG.....	25
4.3 Expressão da proteína Sm14 pelo BCG/ <i>sm14</i>	26
4.4 Multiplicidade de infecção (MOI) BCG:THP-1	26

4.5 Capacidade de proliferação da célula THP-1 infectada pelo BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles.....	29
4.6 Avaliação da viabilidade e estabilidade funcional (expressão do gene <i>kanR</i>) do BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles recuperados de células THP-1	30
4.7. Avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles em células THP-1 por imunocitoquímica	31
4.8 Avaliação das citocinas a partir da infecção com BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles em células THP-1 por Citometria de Fluxo	34
4.9 Comparação entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo.....	39
4.9.1 Detecção de IL-10.....	39
4.9.2 Detecção de IL-12.....	41
4.9.3 Detecção de TNF- α	43
5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÕES	54
7. PERSPECTIVAS	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	grau Celsius
μCi	micro Curie
μL	Microlitro
μg	Micrograma
ADC	Albumina – Dextrose – Catalase
APC	<i>Antigen presenting cells</i> – célula apresentadora de antígenos
API	Associação Panamericana de Infectologia
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATLA	<i>Alternatives to Laboratory Animals</i>
BCG	<i>Mycobacterium bovis</i> Bacilo Calmette-Guérin
BCG-P	<i>M. bovis</i> Bacilo Calmette-Guérin sub-cepa Pasteur 1173P2
BCGr	<i>M. bovis</i> Bacilo Calmette-Guérin recombinante
BCG/pAU5	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepa Pasteur transformado o vetor de expressão pAU5
BCGr/pPL73- <i>sm14</i>	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepa Pasteur 1173P2 transformado com vetor de expressão pPL73 contendo o gene <i>sm14</i> de <i>S. mansoni</i>
BCG/ <i>sm14</i>	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepa Pasteur 1173P2 transformado com o vetor de expressão pAU5 contendo o gene <i>sm14</i> de <i>S. mansoni</i>
Bio-Manguinhos	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
BP	<i>Band pass</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i> – grupo de diferenciação 4
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i> – grupo de diferenciação 8
cm ²	Centímetro quadrado
CMI	<i>Cell-mediated immunity</i> – Imunidade mediada por células
Com	Contagem por minuto
CO ₂	Gás carbônico
CpG	Dinucleotídeo formado pela ligação fosfodiéster de citosina com guanina na mesma fita de DNA
CTFA	<i>Cosmetic, Toiletries and Frangrance Association</i>

DAB	3-3' diaminobenzidina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> – Meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> – Ácido desoxirribonucleico
Dr(a).	Doutor(a)
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECVAM	<i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i>
EUA	Estados Unidos da América
FABP	<i>Fatty acid binding protein</i> - Proteína ligante a ácidos graxos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> – Isotiocianato de fluoresceína
FL	Análise de fluorescência (citometria de fluxo)
FRAME	<i>Fund for Replacement of Animal Medical Experiments</i>
FSC	<i>Foward angle light scatter</i>
g	Gramas
<i>g</i>	Aceleração gravitacional
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i> – Solução salina de Hank
HEPES	Acido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IFN	Interferon
IMPPG	Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
IRAG	<i>Interagency Regulatory Alternatives Group</i>
Kan	Canamicina
<i>KanR</i>	Gene de resistência à canamicina derivado do Tn903
kDa	Kilodaltons
LATER	Laboratório de Tecnologia Recombinante
log	Logaritmo
log ₁₀	Logaritmo na base 10
LPS	Lipopolissacarídeo

LSAB	<i>Labeled StreptAvidin Biotin</i>
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
M1	Macrófago tipo 1
M2	Macrófago tipo 2
MDM	<i>Monocyte-derived macrophage</i> – Macrófago derivado de monócito
MEM	<i>Minimum essential medium of Eagle</i> – Meio mínimo essencial de Eagle
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> - Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitro
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> – Multiplicidade de infecção
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Msc	Mestre
nº	Número
ng	Nanograma
NIAID	<i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i> - EUA
NK	<i>Natural killer cells</i> – Células matadoras naturais
nm	Nanômetro
O ₂	Gás oxigênio
OADC	Ácido oléico – Albumina – Dextrose – Catalase
<i>oriE</i>	Origem de replicação do bacteriófago T4 de <i>Escherichia coli</i>
<i>oriM</i>	Origem de replicação do plasmídeo pAL5000 de <i>Mycobacterium fortuitum</i>
PA	<i>pro analisis</i> - para análise
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> – Padrões moleculares associados ao patógeno
PAPES	Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde
pAU5	Vetor de expressão citoplasmático
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> - Células mononucleares do sangue periférico
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> - Salina tamponada de fosfato

PBS-T	<i>Phosphate-buffered saline Tween20</i> - Salina tamponada de fosfato com Tween20
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
PE	<i>Phycoerythrin</i> - Ficoeritrina
pH	Potencial hidrogenionico
<i>Phsp60*</i>	Promotor <i>hsp60</i> de <i>Mycobacterium bovis</i> BCG modificado
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
POPOP	p-bis[2(5- feniloxazoil)]-benzeno
PPO	2,5-difeniloxazol
Prof(a)	Professor (a)
PRR	<i>Pattern-recognition receptors</i> – Receptores de reconhecimento padrão
R1	Região de análise (citometria de fluxo)
Reg	Registro
rpm	Rotação por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> – Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SFB	Soro fetal bovino
SLIPE	Sociedade Latinoamericana de Infectologia Pediátrica
Sm14	Proteína de <i>Schistosoma mansoni</i>
Sm14r	Proteína recombinante de <i>S. mansoni</i> expressa em <i>E. coli</i>
<i>sm14</i>	Gene de <i>S. mansoni</i>
SSC	<i>Side angle light scatter</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> – Salina tamponada de Tris
TBS-T	<i>Tris-buffered saline Tween 20</i> – Salina tamponada de Tris com Tween 20
Tc	<i>T cytotoxic cell</i> – Célula T citotóxica
TCR	<i>T cell receptor</i> – receptor de célula T
TDR	<i>Special programme for research and training in tropical disease</i>

TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i> - Fator transformador de crescimento beta
Th	<i>T helper cell</i>
Th1	<i>T helper cell type 1</i> – Célula T auxiliar tipo 1
Th2	<i>T helper cell type 2</i> – Célula T auxiliar tipo 2
Timidina-H ³	Timidina tritiada
TLR	<i>Toll like receptor</i> – Receptor do tipo Toll
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alfa</i> - Fator de necrose tumoral alfa
TPA	12-O-tetradecanolforbol-13-acetato
Treg	<i>T regulatory cell</i> – Célula T regulatória
UFC	Unidades formadoras de colônias por mililitro
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
v	Volume
WHO	<i>World Health Organization</i> – Organização Mundial da Saúde
x	Vezes

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Características das cepas de BCGs	16
Tabela 3.2: Anticorpos utilizados no protocolo de imunocitoquímica.....	21
Tabela 3.3: Anticorpos utilizados no protocolo de citometria de fluxo.....	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Visão esquemática da indução do sistema imune gerada por um patógeno ou uma vacina.....	08
Figura 1.2: Diagrama do modelo molecular da proteína Sm14.....	11
Figura 4.1: Microscopia óptica (200 x) de células THP-1, após três passagens, mantidas em meio RPMI 1640 preparado com 0,2% de NaHCO ₃ e suplementado com 10% de SFB.....	24
Figura 4.2: Cultura de <i>M. bovis</i> BCG Pasteur cultivado em meio 7H11 suplementado com 10% de OADC.....	25
Figura 4.3: Expressão da proteína Sm14 produzida pelos quatro clones de BCG/ <i>sm14</i> utilizados nos experimentos de infecção.....	26
Figura 4.4: Expressão de IL-10, IL-12 e TNF- α em células THP-1 infectadas com BCG-P.....	28
Figura 4.5: Atividade proliferativa das células THP-1 infectadas pelo BCG/ <i>sm14</i> e pelos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5)	29
Figura 4.6: Cinética da viabilidade do protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e dos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5) recuperados de células THP-1 e cultivados nos meios Middlebrook 7H11 7H11/Kan.....	31
Figura 4.7: Microscopia óptica (1000 x) de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após 24 horas de infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), detectadas por imunocitoquímica.....	32
Figura 4.8: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica.....	33
Figura 4.9: Determinação da região de análise das células THP-1 mantidas em cultivo celular.....	34

Figura 4.10: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 TNF- α e após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	35
Figura 4.11: Gráfico tamanho (FSC) <i>versus</i> fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	36
Figura 4.12: Gráfico tamanho (FSC) <i>versus</i> fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	37
Figura 4.13: Gráfico tamanho (FSC) <i>versus</i> fluorescência (FL1 ou FL2) da avaliação de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	38
Figura 4.14: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria de fluxo.....	40
Figura 4.15: Percentagem de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria.....	42
Figura 4.16: Percentagem de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria.....	44
Figura 5.1: Modelo esquemático das etapas necessárias para implantação de novos fármacos e imunobiológicos.....	47

RESUMO

As culturas de células vêm sendo utilizadas extensivamente no desenvolvimento e na produção de uma variedade de produtos terapêuticos e profiláticos, tornando-se uma ferramenta indispensável para geneticistas, imunologistas, vacinologistas e a indústria farmacêutica. A adoção de sistemas de ensaios celulares *in vitro* tem sido aplicada como um método alternativo para a substituição ou diminuição do uso de animais nas fases de desenvolvimento, produção e testes de vacinas, demonstrando resultados promissores. Da mesma forma, sistemas computacionais podem ampliar a utilização desta ferramenta para etapas do desenvolvimento de vacinas candidatas na fase pré-clínica. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um protocolo *in vitro* utilizando culturas de células humanas - a linhagem de monócitos THP-1, para a seleção de um protótipo vacinal - a cepa Pasteur de *Mycobacterium bovis* BCG expressando o antígeno Sm14 de *Schistosoma mansoni* (BCG/sm14). Para isso foram empregadas duas metodologias – citometria de fluxo e imunocitoquímica, para a identificação do perfil da expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α . Foram utilizados como controles a cepa Pasteur do *M. bovis* BCG e a construção da cepa Pasteur do *M. bovis* BCG contendo o vetor de expressão pAU5 (BCG/pAU5). Após padronização, a multiplicidade de infecção utilizada para os experimentos foi de 10 bacilos para 1 célula THP-1 (10MOI). A expressão da proteína Sm14 foi detectada em todos os protótipos vacinais. Para assegurar que o protótipo BCG/sm14 era capaz de diferenciar a linhagem de monócitos THP-1 em macrófagos, avaliamos a taxa de crescimento celular e foi possível observar que após a infecção estas células apresentavam o índice de proliferação diminuído em 2 logs em relação à célula não infectada. O protótipo vacinal BCG/sm14 não mostrou diferenças quanto a capacidade de infecção, a taxa de persistência intracelular e a estabilidade da construção plasmidial. As duas metodologias empregadas mostraram resultados discrepantes em relação ao percentual de citocinas expressas após a infecção com o protótipo vacinal ou os BCG controles, mostrando um maior percentual de células positivas quando avaliados por citometria de fluxo. Contudo, mesmo com esta diferença observamos que o protótipo vacinal BCG/sm14 não alterou o perfil de expressão de IL-10, IL-12 e TNF- α . O fato do plasmídeo pAU5 ser um vetor de expressão citoplasmática, sugere que a proteína Sm14 não foi capaz de estimular a mudança de citocinas em monócitos humanos. Experimentos futuros devem investigar o papel do BCG/sm14 em macrófagos maduros, quanto a indução de citocinas pró e anti-inflamatórias, TLR, bem como na indução da resposta imune adaptativa, como a apresentação antigênica, na tentativa de melhor entender a resposta imune a esta vacina candidata.

ABSTRACT

Cell cultures has been used extensively in the development of a broad range of therapeutic and prophylactic products, and are an important tool for geneticists, immunologists, vaccinologists and the pharmaceuticals industry. *In vitro* cell assay has been applied as an alternative method to replace or diminish the use of animal model in the developmental, production in vaccine test phases, with promising results. Otherwise, computational methods should amplify the use of cell cultures tools to test candidate vaccines. The main goal of this work was to develop an *in vitro* protocol using human cell line – monocytic cell THP-1, to select a vaccine prototype – strain Pasteur *Mycobacterium bovis* BCG expressing *Schistosoma mansoni* Sm14-antigen (BCG/sm14). Two methodologies were employed – a flow cytometry and immunocytochemistry, to quantify the expression of IL-10, IL-12 e TNF- α . Pasteur *M. bovis* BCG and the strain Pasteur do *M. bovis* BCG containing the expression vector pAU5 (BCG/pAU5) were used as controls. Multiplicity of infection (MOI) was determined and showed a better 10 bacilli to 1 cells ratios, regarding the expression of intracellular cytokines. Sm14 protein expression was detected in all vaccine prototype before use. To assure that BCG/sm14 was able to differentiate monocytic THP1 cell line in mature macrophage, we evaluated the proliferative ration after BCGs infection and all strain showed the ability to induce monocytic THP1 cells maturation, diminishing in 2.0 logs the cell proliferation. No differences were seen in the uptake, intracellular persistence and plasmidial stability. Interestingly, we observe discrepant results regarding the amount of positive cells expressing cytokines detected by the two methods used, independent of which BCG was tested. The overall results obtained by the cytometric method was high than immunocytochemistry. However, beside these ambiguous results, no alteration in the IL-10, IL-12 and TNF-alfa profile was observed when BCG/sm14 was compared with BCG. These results point to the plamidial BCG construction pAU5 and its intracellular expression, suggesting no modification in the cytokine profile in human monocytic cell lines. Further experiments should be addressed to identify the role of BCG/sm14 in modulate mature macrophage and, the induction of adaptive immune response, as antigen presentation, pro- and anti-inflammatory cytokines, TLR expression and activation, to better understating the vaccine prototype immune response .

1. INTRODUÇÃO

A vacinologia é uma ciência combinatória que estuda a diversidade de agentes patogênicos, o sistema imune humano e preparações vacinais que possam modular a resposta imune para prevenir ou curar as doenças causadas por esses patógenos (Brusic, August & Petrovsky 2005). Sendo a vacina um imunógeno não-patogênico que ao ser inoculado em um indivíduo é capaz de induzir imunidade protetora contra um patógeno específico (Parslow 2004), a vacinação, bem como a limitação à exposição de pessoas saudáveis às infectadas e eliminação da fonte ou meios de disseminação do agente infeccioso, contribui para a prevenção de doenças. As propriedades necessárias para uma vacina ideal são: promover imunidade ao longo da vida, ser largamente protetora contra todas as variantes do patógeno, prevenir a transmissão de doença, induzir a imunidade rapidamente, ser eficaz em todas as pessoas vacinadas, transmitir a proteção materna ao feto, possuir baixo custo, ser estável, ser segura e necessitar de poucas ou, de maneira ideal, uma só administração que induza proteção. (Ada 2001, Beverley 2002, NIAID 2003).

O desenvolvimento das vacinas ao longo da história pode ser destacado de acordo com as revoluções tecnológicas aplicadas na vacinologia (Plotkin 2005a). No final do século XVIII o médico inglês Edward Jenner realizou a experiência que foi considerada o marco da imunologia como ciência. Jenner inoculou, a partir de arranhões feitos no braço de um menino de oito anos (James Phipps), o líquido extraído da vesícula causada pela varíola bovina da mão da ordenhadeira Sarah Nelmer (André 2003, Plotkin & Plotkin 2004). Contudo, somente quase um século após a descoberta de Jenner, Louis Pasteur desenvolveu o conceito que levaria à primeira revolução da vacinologia: a atenuação da virulência de patógenos, criando a primeira vacina em laboratório e instituindo o conceito de vacinação. Pasteur estabeleceu as bases do que ficou conhecida como abordagem clássica para o desenvolvimento de vacinas, que incluem o isolamento do patógeno, a perda da virulência (atenuação) e a imunização com partes do microrganismo ou o microrganismo inteiro (Plotkin & Plotkin 2004, Plotkin 2005b, Serruto & Rappuoli 2006).

No final do século XVIII, Salmon e Smith descreveram o conceito que levaria a segunda revolução tecnológica da vacinologia, a inativação do patógeno para o desenvolvimento de preparações vacinais. A expansão deste conceito levou a

construção de vacinas feitas a partir de toxinas detoxificadas (toxóides) e frações subcelulares como polissacarídeos, proteínas e conjugados (Plotkin & Plotkin 2004, Plotkin 2005a, Plotkin 2005b). A adaptação de cultura de células para o cultivo de vírus visando a obtenção de preparações vacinais foi considerada a terceira grande revolução tecnológica utilizada pela vacinologia (Plotkin & Plotkin 2004, Plotkin 2005a, Plotkin 2005b). A introdução de novas estratégias para o desenvolvimento de vacinas a partir da utilização de técnicas de biologia molecular como: clonagem de genes e expressão de proteínas recombinantes, criação de partículas defectivas, desenvolvimento de vetores vivos atenuados, sequenciamento de genomas, genômica comparativa, proteômica e vacinologia reversa; abriram novas fronteiras na vacinologia para a busca de preparações imunogênicas que sejam efetivas no combate às doenças infecciosas. Essa nova onda de desenvolvimento está sendo considerada como a quarta revolução tecnológica da vacinologia (Ellis 2004, Plotkin 2005a, Plotkin 2005b, Serruto & Rappuoli 2006).

A compreensão e a importância da resposta imune após a vacinação sofreram um avanço notável nos últimos anos (Saalmüller 2006), marcando assim uma nova era para o desenvolvimento de vacinas. Para Plotkin (2005b), o novo foco dos vacinologistas está no desenvolvimento de meios, como vetores, replicons, lipopeptídeos e adjuvantes que dirijam a polarização do sistema imune para uma resposta do tipo 1, ou seja, a estimulação da imunidade celular. Plotkin destaca também o desenvolvimento de novas rotas de imunização tais como intranasal, aerossol, transcutânea, oral e retal (Plotkin 2005b). Já para Rappuoli (2004), a vacinologia atual está focada no processo de obtenção de imunógenos a partir da investigação pan-genômica, análise por microarranjos de DNA (*DNA microarray*) e proteômica, numa abordagem conhecida como vacinologia reversa. Serruto e Rappuoli (2006) enfatizam que o futuro do desenvolvimento de vacinas está na chamada vacinologia estrutural, na qual através da resolução atômica e da estrutura dos antígenos potenciais, será realizado o desenho racional dos epítomos alvos usados como candidatos vacinais. Observa-se então que a integração entre a tecnologia básica, os avanços tecnológicos na biologia molecular e o aumento do entendimento da resposta imune são a base para o desenvolvimento de novos candidatos a preparações vacinais (Rosenthal & Zimmerman 2006).

A imunidade, ou resposta imune, pode ser dividida em dois tipos: a imunidade inata e a imunidade adquirida ou adaptativa. A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa contra agentes patogênicos e consiste no desencadeamento de

mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que já existiam antes do estabelecimento de uma infecção e que atuam da mesma forma em infecções sucessivas. As barreiras anatômicas (pele e epitélio de mucosa), barreiras fisiológicas (temperatura, áreas com baixo pH, mediadores químicos), fagócitos mono e polimorfonucleares e barreiras inflamatórias são parte da imunidade inata (Parslow 2004, Abbas & Lichtman 2005b, McCullough & Summerfield 2005). As células da imunidade inata utilizam receptores de reconhecimento padrão (*pattern-recognition receptors* – PRR) do tipo Toll (*Toll like receptors* - TLRs) para o reconhecimento de estruturas microbianas altamente conservadas que não estão presentes em células de mamíferos, como padrões moleculares associados ao patógeno (*pathogen-associated molecular patterns* – PAMPs). Os TLRs possuem a capacidade de reconhecer diferentes PAMPs, como seqüências CpG de DNA não metiladas, lipídeos e carboidratos complexos como lipopolissacarídeos (LPS) e ácidos teicóicos (Reis e Sousa 2004b, Krutzik *et al.* 2005, Rosenthal & Zimmerman 2006).

A imunidade adaptativa caracteriza-se por sua alta especificidade e por ampliar a magnitude da resposta após sucessivas exposições a um determinante antigênico. Além dos muitos mecanismos da imunidade natural necessários à eliminação dos microorganismos invasores, a imunidade adaptativa utiliza a seleção e a mutação somática na geração de seu repertório imune desenvolvendo duas outras propriedades adicionais: a memória em relação aos contatos anteriores com um determinado antígeno, de modo que as exposições subseqüentes estimulem respostas de defesa gradativamente mais efetivas, e a capacidade de amplificar os mecanismos protetores da imunidade natural, direcionando-os para os locais de entrada do antígeno e melhorando o processo de eliminação dos elementos estranhos ao organismo hospedeiro (Costa-Carvalho & Solé 2000). A imunidade adaptativa é classificada como humoral ou celular em função do componente do sistema imunológico intermediador da resposta imune. A imunidade humoral é mediada por anticorpos, que são capazes de efetuar o reconhecimento específico agindo na neutralização de microorganismos e toxinas, na ativação do sistema do complemento e na opsonização de antígenos para aumento da fagocitose. A imunidade celular ou mediada por células (*cell-mediated immunity* – CMI) refere-se à resposta imune efetora das células T atuando na ativação de fagócitos, estimulação das atividades microbicidas dos macrófagos, células T e células *natural killer* (NK) na destruição de células infectadas. A CMI atua na defesa contra microorganismos

intracelulares, na imunidade antitumoral e na rejeição de aloenxertos (Parslow 2004, McCullough & Summerfield 2005).

As células T podem ser classificadas em dois grandes grupos de acordo com a expressão dos antígenos de superfície: T CD4 e T CD8. As células T CD8 efetoras são funcionalmente conhecidas como células T citotóxicas (T *cytotoxic* – Tc). As células Tc atuam principalmente na lise de células infectadas com patógenos presentes em seu citoplasma, desempenhando sua função através da liberação de dois tipos de citotoxinas: as granzimas, que são capazes de induzir apoptose na célula-alvo e as perforinas, que perfuram a membrana celular da célula-alvo facilitando a ação das granzimas (Esser *et al.* 2003, Kaufmann & Flynn 2005). Já as células T CD4 efetoras são funcionalmente conhecidas como células T auxiliares (T *helper* – Th). As células Th desempenham um papel central na função de vários processos como ativação, inibição, regulação, diferenciação e proliferação de diferentes tipos celulares como as células T CD8, células B, células NK, eosinófilos e macrófagos, tanto por contato célula-célula como pela produção de citocinas (Esser *et al.* 2003, Kidd 2003). As células Th são divididas principalmente em duas sub-populações fenotipicamente distintas, T *helper* tipo 1 (Th1) ou T *helper* tipo 2 (Th2), que proporcionam a estruturação de um modelo útil na compreensão da imunorregulação dependente de célula T (Mosmann & Coffman 1989, Mosmann 1991, McCullough & Summerfield 2005).

O conceito de células Th1/Th2 baseia-se na dicotomia do perfil de citocinas expressas, uma vez que cada sub-população de célula Th amplifica a si mesma e promove a regulação cruzada da sub-população recíproca. As citocinas produzidas por células Th1 são reconhecidamente capazes de suprimir a proliferação celular, a síntese de citocinas e/ou a atividade biológica induzidas por citocinas da resposta Th2, e vice-versa. Nas respostas imunes geradas pelas células Th1 as principais citocinas produzidas são as interleucinas (IL) 2 e o interferon gama (IFN- γ) direcionando o sistema imune para uma resposta mediada por células. A produção de anticorpos não é uma característica proeminente da resposta Th1, mas sua combinação com a resposta celular é necessária no combate de infecções intracelulares e fúngicas e de células cancerosas através de mecanismos diretos (destruição de células infectadas) e indiretos como a ação do interferon na proteção de células não infectadas (Esser *et al.* 2003, Kidd 2003, Rosenthal & Zimmerman 2006). Já as respostas imunes geradas pelas células Th2 são especialmente eficazes contra parasitas extracelulares e toxinas por mecanismos dependentes de

anticorpo e as citocinas dominantes produzidas são IL-4, IL-5, IL-10, e IL-13, direcionando para uma alta produção de anticorpos (Esser *et al.* 2003, Kidd 2003, Clingan *et al.* 2006, Rosenthal & Zimmerman 2006).

As células T não possuem receptores capazes de reconhecer diretamente antígenos. Os receptores de antígenos das células T (*T cell receptors* – TCRs) reconhecem somente fragmentos de antígenos expostos na superfície de outras células associados principalmente a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (*Major histocompatibility complex* - MHC). Há dois tipos principais de moléculas de MHC, denominadas de moléculas de MHC de classe I e moléculas de MHC de classe II e seu padrão de expressão está intimamente ligado às funções das células T. As moléculas MHC de classe I são expressas por todas as células do organismo exceto hemácias, sendo complexadas a antígenos encontrados no citoplasma celular e reconhecidas pelas células Tc. As moléculas MHC de classe II são expressas principalmente por células especializadas conhecidas como células apresentadoras de antígenos (*antigen presenting cells* – APC), que apresentam antígenos oriundos de vesículas endocíticas as células Th (Esser *et al.* 2003).

As APCs são células especializadas na captura de microorganismos e outros antígenos, na apresentação desses antígenos às células T e na expressão de sinais que estimulam a proliferação e diferenciação de linfócitos (Takahashi 2003, Abbas & Lichtman 2005b), possuindo um papel crucial na interação entre as imunidades inata e adaptativa. Seus principais representantes são as células dendríticas, os linfócitos B e os macrófagos (Guermonprez *et al.* 2002, Abbas & Lichtman 2005b). As células dendríticas são conhecidas como APCs profissionais por possuírem como função a captura e a apresentação de antígenos às células T virgens, promovendo juntamente com sinais co-estimulatórios, a expansão clonal e a diferenciação em células T efetoras (Guermonprez *et al.* 2002, Takahashi 2003, Reis e Sousa 2004a). As células B, dentre outras funções, são capazes de apresentar antígenos às células T efetoras sendo essenciais para a produção de anticorpos dependentes de células Th (Parlow 2004).

Os macrófagos são células fagocitárias mononucleadas, derivados dos monócitos sanguíneos e são encontrados nos tecidos desempenhando importantes papéis nas respostas imunes inata e adquirida. Possuem um papel central na resposta inicial à infecção antes da ação da imunidade mediada pelas células T e B, sendo importantes na fase de indução de inflamação, reorganização e reparo dos

tecidos, além de realizarem funções efetoras. São classificados como células apresentadoras de antígenos e têm diversas atividades, como atividade antimicrobiana e antitumoral, modulação de várias células, e promoção de quimiotaxia (Auwerx 1991, Mills *et al.* 2000, Berges *et al.* 2005).

Os macrófagos foram denominados M1 e M2 de acordo com o seu padrão de ativação (Mills *et al.* 2000). Assim, macrófagos M1 provenientes de células Th1 apresentam uma resposta efetora caracterizada pela produção dominante de óxido nítrico (NO) em resposta ao LPS ou IFN- γ exógeno. Macrófagos M2, de linhagens Th2, por sua vez, exibem um perfil tolerante caracterizado pela produção de altos níveis de fator transformador de crescimento beta (*transforming growth factor beta* - TGF- β) (Bastos *et al.* 2002, Mantovani, Sica & Locati 2005). O padrão de ativação assumido por esses macrófagos parece ser independente de linfócitos, uma vez que macrófagos de camundongos apresentam a mesma polarização. Esse fato sugere a importância das citocinas produzidas por essas células na regulação de suas funções. A influência da IL-10, IL-12, IL-18, IFN- α e IFN- γ na regulação autócrina de macrófagos tem sido descrita, demonstrando que os macrófagos não apenas obedecem às ordens dos linfócitos T, como podem até mesmo comandar o tipo de resposta dessas células. Adicionalmente, através das citocinas produzidas por eles, são aptos a se auto-regularem (Di Marzo *et al.* 1994, Fantuzzi *et al.* 2000, Mills *et al.* 2000, Xing, Zganiacz & Santosuosso 2000, Bastos *et al.* 2002, Mantovani, Sica & Locati 2005).

As citocinas constituem um grupo de proteínas de baixo peso molecular, geralmente glicosiladas, secretadas por diferentes células do sistema imune, como linfócitos, monócitos e macrófagos. Suas ações são geralmente pleiotrópicas, podendo atuar de forma autócrina, parácrina e endócrina, na mediação de diferentes efeitos biológicos (Abbas & Lichtman 2005a). Dentre as citocinas utilizadas para a avaliação de protótipos vacinais na ativação de APCs, podemos destacar TNF- α , IL-10 e IL-12 (Henriques & Sampaio 2002, Abbas & Lichtman 2005a). A IL-10 é uma citocina reguladora secretada por macrófagos ativados e por algumas células Th. Tem ação anti-inflamatória, agindo na inibição de macrófagos e células dendríticas ativados, inibindo a ação de IL-12, TNF- α e IFN- γ , com efeitos associados ao término das reações da CMI (Standiford 2000, Atkinson *et al.* 2000, Abbas & Lichtman 2005a). A IL-12 é a principal citocina mediadora da resposta imune inata a patógenos intracelulares, dentre os quais as micobactérias, sendo um importante indutor de CMI. Atua na ativação de células T citotóxicas e células NK induzindo a

produção de INF- γ , o qual ativa os macrófagos infectados e na diferenciação das células Th1, possuindo um importante papel na interação entre a imunidade inata e adaptativa (Atkinson *et al.* 2000, Abbas & Lichtman 2005a). O TNF- α é uma das principais citocinas mediadoras da resposta pró-inflamatória produzida principalmente por fagócitos mononucleares ativados além de células T, células NK e mastócitos. Atua principalmente no recrutamento de neutrófilos e monócitos para os sítios de infecção, na indução de macrófagos e células endoteliais para secreção de quimiocinas e na indução de apoptose em algumas células (Atkinson *et al.* 2000, Standiford 2000, Abbas & Lichtman 2005a).

Os monócitos e macrófagos possuem um papel crucial na apresentação de antígenos estranhos a outras células do sistema imune e na produção de sinais que direcionam o padrão da resposta imune necessária para cada tipo de patógeno. Dentre os sinais podemos destacar as citocinas, que são proteínas imunomoduladoras que ajudam a direcionar a resposta imune em diversos processos inflamatórios incluindo processos infecciosos (Xing, Zganiacz & Santosuosso 2000, Berges *et al.* 2005). Por essas características, os macrófagos vêm sendo utilizados para avaliar o perfil imunogênico de diferentes antígenos candidatos à vacina (Campbell, Mann & Chadee 2000, Misumi *et al.* 2003, Ciabattini *et al.* 2006). Adicionalmente, é importante considerar que entre os principais requerimentos para o sucesso da vacinação está a ativação das APCs, que envolve o processamento de antígenos, a expressão de fatores co-estimulatórios, e a secreção de citocinas, que é essencial para o início da resposta imune (Ada 2004).

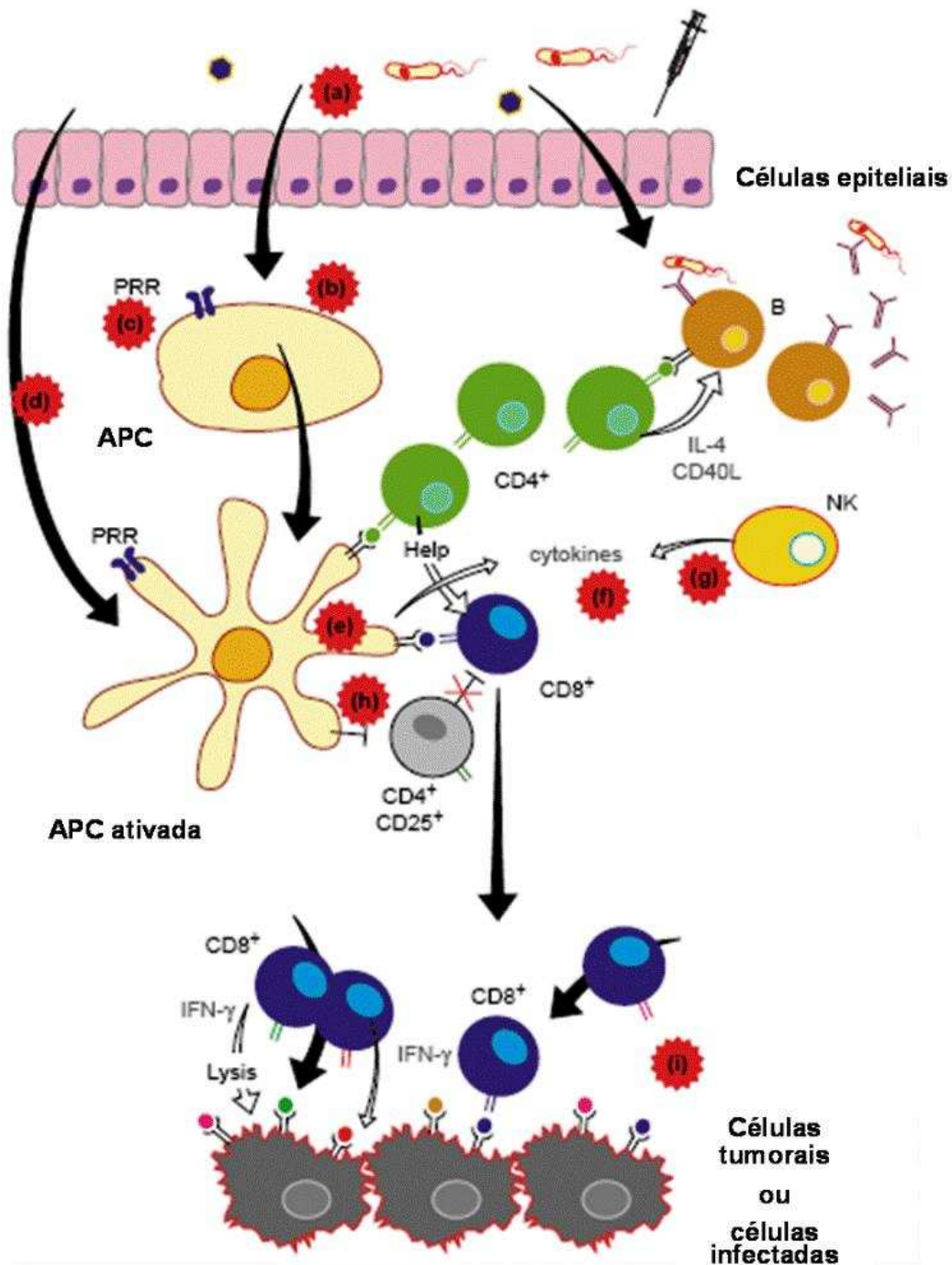


Figura 1.1: Visão esquemática da indução do sistema imune gerado por um patógeno ou uma vacina (Adaptado de Wack & Rappuoli 2005). As letras de (a) a (i) indicam situações onde o melhoramento de vacinas pode levar a respostas imunes mais eficientes. (a) A via de inoculação pode influir no tipo de resposta imune e reduzir o número de doses. (b) O antígeno particulado é reconhecido mais facilmente por APCs em relação ao antígeno solúvel. (c) Aumento da ativação de APCs através do reconhecimento de imunoestimulantes pelas PRRs. (d) A maturação e o carreamento de antígenos *in vitro* pelas APCs são candidatos vacinais promissores. (e) A vacinação de DNA leva a uma maior eficiência na apresentação de antígenos pelas moléculas de MHC de classe I. (f) O uso de citocinas como adjuvante natural de vacinas. (g) O recrutamento de células NK pode ser relacionado à produção inicial de citocinas do tipo Th1. (h) As vacinas podem atuar no efeito regulatório das células Treg CD4 CD25 visando a quebra da tolerância imunológica. (i) A pré-existência de células T específicas para antígenos expressos por células tumorais não contidos na vacina expande-se após a vacinação, predominando na resposta anti-tumor.

O advento da cultura celular no início do século passado surgiu como um método para estudar o comportamento de células dos animais sem as variações sistêmicas que poderiam surgir no animal tanto durante a homeostase, como durante um estado de estresse de um experimento (Harrison 1910, Carrel 1912 *apud* Freshney 2000b). As culturas de células vêm sendo utilizadas extensivamente para o desenvolvimento e a produção de uma variedade de produtos terapêuticos e profiláticos incluindo hormônios, citocinas, enzimas, antibióticos e vacinas tornando-se, por essa razão, uma ferramenta indispensável para geneticistas, imunologistas, vacinologistas e, especialmente, para a indústria farmacêutica (Freshney 2000a, FDA 2006).

Em 1991, Auwerx comparou diferentes linhagens de células mielóides de origem humana (HL-60, U-937, KG-1, HEL e THP-1) e concluiu que as células THP-1, após o tratamento com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), podem servir de modelo para o estudo *in vitro* dos mecanismos de regulação gênica, funções fisiológicas e diferenciação monócito/macrófago, assim como podem ser utilizadas no estudo dos vários aspectos biológicos do macrófago como o seu papel nos mecanismos de defesa e como célula secretora (Stokes & Doxsee 1999, Medeiros, 2001, Oliveira, Charlab & Pessolani, 2001, Ritelli *et al.* 2003, Theus, Cave & Einsenach, 2004, Berges *et al.* 2005, Zhao *et al.* 2005, Amadori *et al.* 2006).

A célula THP-1 é um monócito obtido a partir do sangue de uma criança com leucemia aguda (Tsuchiya *et al.* 1980, ATCC 2006). Na sua caracterização foi descrito que essas células apresentam capacidade fagocítica, expressão de lisozima e teste negativo para o vírus Epstein-Barr (Tsuchiya *et al.* 1980). Além disso, não possuem atividade citolítica dependente de anticorpo e sua diferenciação pode ser induzida por compostos do tipo ésteres de forbol como, por exemplo, 12-O-tetradecanolforbol-13-acetato (TPA) ou PMA (Tsuchiya *et al.* 1980, Stokes & Doxsee 1999, ATCC 2006).

Theus, Cave & Einsenach (2004) destacaram que as vantagens do uso da linhagem celular THP-1 como modelo de diferenciação monócito/macrófago *in vitro* são a invariabilidade da sua função de macrófago e a reprodutibilidade do crescimento celular o que permite seu estudo em diferentes estágios (normal *versus* ativado). Além disso, foi demonstrado que a diferenciação da THP-1 pode ser utilizada como modelo experimental para maturação de células dendríticas humanas

(Berges *et al* 2005) e como modelo para a avaliação da resposta inflamatória a diferentes ácidos graxos poliinsaturados (Zhao *et al.* 2005).

Stokes e Doxsee (1999) demonstraram que as células THP-1 podem ser utilizadas como modelo para investigar as interações micobacterianas em macrófagos e Medeiros (2001) utilizou-as como substrato para a avaliação da estabilidade estrutural e funcional de cepas de *Mycobacterium bovis* bacilo Calmette-Guérin (BCG) recombinante (BCGr) expressando antígeno de *Bordetella pertussis*. Oliveira, Charlab & Pessolani (2001) compararam o nível de expressão de TNF- α em células THP-1 infectadas com BCG e *Mycobacterium leprae* e, posteriormente, o uso das células THP-1 foi proposto para o desenvolvimento de uma alternativa rápida para a detecção de *M. bovis* no diagnóstico de tuberculose bovina (Ritelli *et al.* 2003, Amadori *et al.* 2006), e como modelo para avaliação da virulência e da persistência intracelular de micobactérias modificadas geneticamente (Lewis *et al.* 2003).

O Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) vem trabalhando desde 1995, com o apoio dos programas PAPES (Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde) e PDTIS (Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e de Bio-Manguinhos, na tecnologia para modificação genética da vacina BCG com o objetivo de desenvolvimento de vacinas vetorizadas contra agentes infecciosos e parasitários. Nesse processo vários cepas de BCG recombinante (BCGr) foram construídas visando a expressão de antígenos protetores de diversos patógenos como *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, o vírus da Hepatite B, entre outros (Medeiros 2001, Santos 2002, Rezende *et al.* 2005, Medeiros *et al.* 2005). Como parte desse mesmo projeto Argondizzo desenvolveu, em 2005, diferentes protótipos vacinais de BCGr expressando a proteína Sm14 de *Schistosoma mansoni* (Figura 1.2) como possíveis alternativas vacinais para a imunoprofilaxia da esquistossomose.

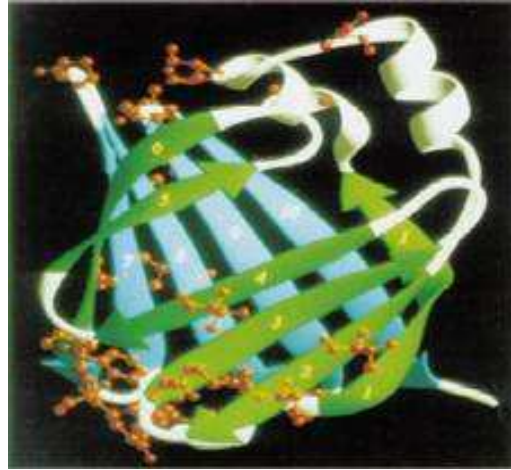


Figura 1.2: Diagrama do modelo molecular da proteína Sm14 (Adaptado de Tendler *et al* 1996)

A esquistossomose é um problema mundial. Estima-se atualmente que pelo menos 200 milhões de pessoas estejam infectados pelo *Schistosoma mansoni* e que mais de 600 milhões de indivíduos estejam em risco no Brasil e no mundo (Argondizzo 2005, Varaldo *et al.* 2006). Dentre as razões para a obtenção de uma vacina efetiva contra o *Schistosoma mansoni* está a elevada frequência da doença na população de muitas regiões, principalmente em países em desenvolvimento, podendo levar os pacientes com a forma hepatoesplênica a um padecimento crônico grave e mortal, sendo assim um grande desafio para a Saúde Pública (WHO 2000). No entanto, a Organização Mundial da Saúde (WHO) através de seu Programa Especial para Treinamento e Pesquisa (TDR), identificou seis antígenos como candidatos para o desenvolvimento de uma vacina. Dentre esses antígenos destaca-se a proteína Sm14, que é uma proteína ligante a ácidos graxos (FABP), de 14 kDa presente no esquistossômulo adulto (Chitsulo *et al.* 2000, WHO 2000, Al-Sherbiny *et al.* 2003).

Na busca de uma vacina candidata contra a esquistossomose, a estratégia de utilização da vacina BCG como vetor para a expressão de antígenos de *S. mansoni* *in vivo* é provavelmente uma das iniciativas mais importantes e de melhor relação custo - benefício no momento para o controle da esquistossomose em países sub-desenvolvidos ou em desenvolvimento (Kremer *et al.* 1998, Dai *et al.* 2003, Varaldo *et al.* 2004, Argondizzo 2005, Varaldo *et al.* 2006). Isso ocorre porque o BCG apresenta um elenco de vantagens de difícil superação entre os vetores vivos atenuados disponíveis no momento, tais como o fato de já ter sido administrado a

bilhões de pessoas no mundo inteiro com baixo índice de efeitos colaterais, poder ser administrado em qualquer época após o nascimento, não ser afetado pelos anticorpos maternos, apresentar baixo custo de produção e ser uma das vacinas mais termoestáveis que se conhece (Smith & Starke 2004, Bonah 2005, SLIPE & API 2005, WHO 2006). Além disso, possui baixo custo de produção, é estável do ponto de vista da atenuação, é controlável por antibióticos, apresenta tropismo por células responsáveis pela montagem da resposta imune (células dendríticas, macrófagos e células linfóides) e é capaz de induzir uma resposta imune celular e humoral contra bactérias, vírus, parasitas e toxinas (Ohara & Yamada 2001, Smith & Starke 2004, SLIPE & API 2005, WHO 2006). Essas características fazem do BCG um dos mais promissores vetores vivos atenuados para uma plataforma vacinal visando a liberação de antígenos heterólogos protetores *in vivo* (Medeiros 2001, Ohara & Yamada 2001, Santos 2002, Smith *et al.* 2001, Argondizzo 2005, Varaldo *et al.* 2004, Varaldo *et al.* 2006).

A capacidade do *M. bovis* BCG sub-cepa Pasteur transformado com plasmídeo pPL73 expressando a proteína Sm14 de *S. mansoni* (BCGr/pPL73-sm14) de induzir efeito protetor semelhante ou maior do que a proteção induzida por três doses da mesma proteína produzida e purificada a partir de *Escherichia coli*, foi avaliada na Fundação Oswaldo Cruz utilizando modelo murino para estudos de proteção, via intraperitoneal, com uma ou duas doses do BCGr/pPL73-sm14, em combinação ou não, com uma dose de reforço da proteína recombinante Sm14 purificada. Nessas condições demonstrou-se que o BCGr/pPL73-sm14 em dose única foi capaz de induzir aproximadamente 50% de proteção. No entanto, apesar dos camundongos vacinados com BCGr/pPL73-sm14 via intraperitoneal não apresentarem anticorpos anti-Sm14, esplenócitos desses animais liberaram IFN- γ quando estimulados com a proteína recombinante Sm14r, sendo assim capaz de induzir níveis de proteção similares àqueles induzidos pela proteína Sm14r, com a vantagem do BCGr/pPL73-sm14 ser administrado em dose única (Varaldo *et al.* 2004).

Apesar da existência na FIOCRUZ de modelo murino de proteção padronizado e aprovado internacionalmente para a avaliação de protótipos vacinais contra a esquistossomose, o grande desafio do projeto para uma nova vacina, com o protótipo BCG/sm14, é a demonstração de proteção em modelo humano. Por essa razão, objetivamos nesse trabalho o desenvolvimento de um protocolo visando o uso de células humanas na avaliação e seleção de vacinas candidatas contra a

esquistossomose. Com essa finalidade, utilizamos como substrato monócitos humanos derivados da linhagem THP-1 para avaliação e quantificação da expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α verificadas após a infecção das células THP-1 com o protótipo vacinal BCG/*sm14*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Demonstrar a viabilidade de um sistema de avaliação *in vitro* para protótipos vacinais baseado no perfil de citocinas expressas pela linhagem celular de monócitos humanos THP-1.

2.2 Objetivos Específicos

- Criar um protocolo de infecção com o *Mycobacterium bovis* BCG em células THP-1
- Avaliar a estabilidade funcional, o grau de infecciosidade e a persistência intracelular do protótipo vacinal BCG/*sm14* em células THP-1
- Avaliar a capacidade do protótipo vacina BCG/*sm14* de induzir a diferenciação e maturação de células THP-1
- Avaliar, quantificar e comparar a expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α após infecção com protótipo vacinal BCG/*sm14* e com os BCGs controles (BCG Pasteur e construção BCG/pAU5) em células THP-1

3. METODOLOGIA

3.1 Cultivo da célula THP-1

A linhagem celular THP-1 (ATCC nº. TIB 202) foi obtida do acervo do Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) de Bio-Manguinhos, Fiocruz mantidos em nitrogênio líquido (-196°C) por no máximo de 12 meses. As células foram descongeladas de criotubos Posteriormente, foram realizadas três lavagens com PBS [137mM de NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 2.7mM KCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 10mM Na₂HPO₄ (Merck) e 1.8mM KH₂PO₄ (Merck)] 1X pH 7.4. Para a manutenção celular foram testados, diversos meios de cultura (MEM, D-MEM e RPMI 1640) e suplementos [soro fetal bovino inativado – SFB (Gibco Life Technology / Invitrogen, Grand Island, EUA), HEPES (Gibco), L-glutamina Sigma-Aldrich), NaHCO₃ (Merck), 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), piruvato de sódio (Sigma-Aldrich), estreptomicina/penicilina (Gibco), gentamicina (Gibco)]. Após observação morfológica das células por microscopia óptica (400 x), definiu-se que para os experimentos propostos seria utilizado o meio de cultura foram cultivadas inicialmente em meio RPMI 1640 (Gibco) formulado com 0,2% (v/v) de NaHCO₃ (Sigma-Aldrich), suplementado com 20% (v/v) de SFB e mantidas em garrafas T de 25 cm² (Corning, Corning, EUA) a 37°C em atmosfera com 5% de gás carbônico (CO₂) por 3 dias.

Quando da necessidade de se ampliar o acervo desta linhagem, as células foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos, lavadas duas vezes em PBS e ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB. A concentração e viabilidade celular foram determinadas em hemocítmetro por microscopia óptica (100 x) utilizando-se a diluição de 1:50 em azul de tripan 0,4% (Gibco). Para a criação dos lotes de trabalho, após as etapas de centrifugação e lavagem, as células foram ressuspensas na concentração de 1 x 10⁷ células/mL em solução de criopreservação [90% SFB e 10% dimetil sulfóxido (DMSO - Sigma-Aldrich)] e mantidas em nitrogênio líquido a – 196°C.

No preparo das células para a realização dos experimentos, as células foram removidas do meio de cultura original, lavadas duas vezes em PBS, ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB. Após a quantificação as células foram ressuspensas na concentração de 1 x 10⁶ células/mL em RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB.

3.2. Cultivo das cepas de BCG

Para a presente proposta foi utilizado o protótipo vacinal *M. bovis* BCG sub-cepça Pasteur 1173P2 transformada com o vetor plasmidial pAU5 contendo o gene *sm14* de *S. mansoni* (BCG/*sm14*). Como controle dos experimentos, foram utilizados a amostra vacinal *M. bovis* BCG sub-cepça Pasteur 1173P2 (BCG-P), assim como o *M. bovis* BCG sub-cepça Pasteur transformado o plasmídeo pAU5 (BCG/pAU5). Os BCGs recombinantes foram desenvolvidos no LATER pelos pesquisadores Dr. Douglas MacIntosh e Msc. Ana Paula C. Argondizzo (Argondizzo 2005) (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Características das cepas de BCG

Cepas	Características
BCG-P	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepça Pasteur 1173P2
BCG/pAU5	<i>M. bovis</i> BCG sup-cepça Pasteur Vetor pAU5: <i>kanR</i> , <i>oriE</i> , <i>oriM</i> , <i>Phsp60</i> *
BCG/ <i>sm14</i>	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepça Pasteur Vetor pAU5/ <i>sm14</i> : <i>kanR</i> , <i>oriE</i> , <i>oriM</i> , <i>Phsp60</i> *, <i>sm14</i>

pAU5 - vetor de expressão citoplasmático

kanR - gene de resistência à canamicina derivado do Tn903

oriE - origem de replicação do bacteriófago T4 de *Escherichia coli*

oriM - origem de replicação do plasmídeo pAL5000 de *Mycobacterium fortuitum*

*Phsp60** - promotor *hsp60* de *Mycobacterium bovis* BCG modificado

sm14: gene de *Schistosoma mansoni*

Os BCGs foram estocados em alíquotas e armazenados a -70°C. No momento do uso as alíquotas foram descongeladas e cultivadas em 20 mL de caldo Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA) suplementado com 10% (v/v) da solução Albumina – Dextrose – Catalase (ADC - Difco), 0,05% (v/v) de Tween 80 (Merck) e 0,2% (v/v) de glicerol (Sigma-Aldrich) a 37⁰ C e 5% CO₂ por 10 dias, quando atingem a fase exponencial de crescimento.

Para o preparo dos inóculos, o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG e BCG-pAU5) foram obtidos a partir de culturas em fase exponencial. Os BCGs foram

centrifugados a 1950 x g e lavados duas vezes em PBS. Após a lavagem, a concentração de cada amostra de BCG foi ajustada com PBS para o padrão 1 da escala de MacFarland (MacFarland, 1907), ou seja, $3,0 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro. Uma alíquota de 10 μ L desta suspensão bacteriana foi quantificada em hemocitômetro por microscopia ótica (100x), para confirmação da leitura por turbidez.

Devido à dificuldade para a determinação da viabilidade dos BCGs em UFC utilizando o meio Middlebrook 7H10 (Difco) suplementado com 10% (v/v) de ADC preparado no laboratório, buscaram-se diferentes alternativas, como a substituição do lote do meio Middlebrook 7H10, utilização do meio Middlebrook 7H11 e suplementação dos meios com ADC e OADC comercial (Difco).

Em cada experimento, o número de bactérias viáveis foi determinado através de plaqueamento de diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) em triplicata, em meio ágar Middlebrook 7H11 (Difco) suplementado com 10% (v/v) da solução de Ácido oléico - Albumina - Dextrose - Catalase (OADC – Difco) e 0,2% (v/v) de glicerol. As placas foram incubadas por quatro semanas em estufa a 37°C em 5% CO₂.

3.3 Avaliação da expressão da proteína recombinante Sm14 em BCG/sm14

Para a confirmação da expressão da Sm14 pela cepa BCG/sm14 foi utilizado a técnica de *western blotting* com base no protocolo descrito por Argondizzo (2005). Amostras de 4 mL das culturas bacterianas foram centrifugadas por 5 minutos a 6500 x g a temperatura ambiente sendo o precipitado rompido por lise mecânica utilizando-se 0,5 g de pérolas de vidro de 0,5 mm de diâmetro (BioSpec Products – Bartlesville, EUA), 60 μ L de tampão Tris-HCl 1 mM 50 mM pH 6.8 e 20 μ L de tampão de amostra 4X (Tris-HCl 50mM pH 6,8, DTT 100mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%). As amostras foram agitadas inicialmente por 45 segundos sendo colocadas em gelo por um minuto e posteriormente agitadas por 30 segundos, utilizando-se o aparato “Mini Beadbeater” (Biospec Products, Bartlesville, Canada). Em seguida, as amostras foram fervidas por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida 13,5% [técnica de SDS-PAGE (Laemmli 1970)] com espaçador de 1 mm. A corrida foi realizada a 100 volts, no gelo. O material do gel foi transferido para membrana de duralose (Duralose – UV™ Membranes – Stratagene, La Jolla, CA, EUA), sendo a transferência realizada por 90 minutos a 90 volts, no gelo.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada em solução de 3% (p/v) de albumina bovina (BSA - Sigma-Aldrich) em PBS pH 7.4 com 0,02% (v/v) de Tween 20 (PBS-T) por um período de 2 horas a temperatura ambiente e sob leve agitação. A seguir a membrana foi incubada com o anticorpo primário policlonal anti-Sm14 (produzido em coelhos New Zealand no Laboratório de Esquistossomose Experimental, Departamento de Helminologia, IOC, FIOCRUZ), diluído 1:500 ou 1:1000. A membrana foi incubada com o anticorpo primário a temperatura ambiente por um período de 16 a 18 horas (*overnight*), a seguir a membrana foi lavada duas vezes com PBS-T por cerca de 40 minutos e duas vezes com PBS pelo mesmo tempo. O anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich), foi diluído na razão 1:30.000 em PBS-T e a membrana incubada por 2 horas sob agitação leve a temperatura ambiente. A seguir procederam-se novamente as lavagens como descrito anteriormente. Após as lavagens, a membrana foi revelada com 5 mL da solução “Western Blue^R Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase” (Promega, Madison, EUA).

3.4 Padronização da multiplicidade de infecção (MOI) do BCG-P

No intuito de verificar a produção de citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α por células THP-1 induzidas por diferentes inóculos de BCG-P, as células foram infectadas numa relação de 5, 10 ou 50 UFC de BCG para cada célula THP-1. Para este ensaio foram definidos apenas dois tempos de infecção: 4 e 24 horas. Foram incubadas 1×10^6 células THP-1 com 5×10^6 , 1×10^7 ou 5×10^7 de BCG-P, em triplicata, mantidos em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB em tubos cônicos de 1,5 mL e incubadas por 4 horas, sob agitação (120 rpm) a 37°C em ambiente com 5% CO₂.

Após este período, as amostras foram centrifugadas a 400 x g e lavadas três vezes com PBS. Após a lavagem, as amostras referentes a avaliação de 4 horas de infecção foram homogeneizadas com 1 mL de meio RPMI 1640, sendo retirados 100 μ L para a recuperação dos BCGs intracelulares, e 900 μ L para avaliação da expressão de citocinas secretadas por células THP-1 infectadas com BCG pela técnica de citometria de fluxo. Já as amostras de 24 horas de infecção, foram homogeneizadas com 1 mL de meio RPMI 1640 com 10% (v/v) de SFB e incubados, sob agitação (120 rpm) a 37°C em ambiente com 5% CO₂ até o término do tempo

proposto (24 horas) sendo posteriormente processadas da mesma forma que as amostras de 4 horas.

Para o acompanhamento da viabilidade dos BCGs intracelulares, nos 100 μ L retirados das amostras, foram adicionados 900 μ L de tampão PBS com 0,1% (v/v) de Tween 80 (Pro Analysis, Rio de Janeiro) e centrifugados por 10 minutos a 6500 x g, para lisar as células THP-1 e obter os BCGs antes internalizados. O precipitado então foi diluído em 100 μ L de meio Middlebrook 7H9 e plaqueado em meio Middlebrook 7H11 para determinação de UFC, como descrito no item 3.2.

3.5 Infecção do BCG/*sm14* e BCGs controles em células THP-1

Os experimentos envolvendo a produção de citocinas em células THP-1 infectadas com BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/ ρ AU5) foram realizados como descrito no item 3.4, utilizando MOI de 10 micobactérias para 1 célula THP-1 nos tempos de 4, 24 e 48 horas pós-infecção. Para a análise do perfil de citocinas expressas pela célula THP-1 infectada com as diferentes amostras de BCG utilizaram-se as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo.

3.6 Avaliação da capacidade de proliferação celular da célula THP-1

Para avaliar a capacidade de replicação e a viabilidade celular das células THP-1 infectadas com BCG/*sm14* e os BCGs controles, um cultivo celular foi estabelecido por um período de 24 e 48 horas após a infecção. As células THP-1 foram infectadas com MOI de 10 micobactérias para 1 célula THP-1 como descrito no item 3.3. As amostras contendo $2,5 \times 10^5$ células THP-1 infectadas ou não com os BCGs, foram suspensas em 100 μ L de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB por poço em placas de 96 poços. Dezesesseis horas antes do término do tempo de infecção, foi adicionado 1 μ Ci de timidina tritiada (Timidina-H³ - Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA) por poço e as placas foram mantidas em estufa a 37°C em ambiente com 5% CO₂. Ao término dos tempos de infecção (24h e 48h) as placas foram congeladas a -20°C até a realização da leitura.

No dia de leitura, as placas foram descongeladas a temperatura ambiente e as amostras foram transferidas através do coletor de células (Cell Harvester - Skation Instruments AS, Lier, Noruega) para o papel de filtro (FilterMAT - Skation Instruments AS). As amostras no papel de filtro foram colocadas em tubos de

cintilação sendo adicionado 1 mL por tubo de solução de cintilação [Difeniloxazol (PPO - Merck), Bis-feniloxasolilbenzeno (POPOP - Merck), Tolueno (Merck)]. As amostras foram contadas em espectrômetro de cintilação líquida (TRI-CARB® 1600 CA, Packard, Milano, Itália) e o resultado expresso em contagem por minuto (cpm).

3.7 Avaliação da estabilidade funcional (expressão do gene *kanR*) do vetor de expressão pAU5 dos BCGr

A confirmação das cepas recombinantes de BCG transformadas com os plasmídeos pAU5 e pAU5-*sm14* foi determinada através do plaqueamento de diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}), em triplicata, dos inóculos utilizados para infecção e dos BCGs recuperados das células THP-1 nos diferentes tempos de infecção (descrito no item 3.4), em meio ágar Middlebrook 7H11 suplementado com 10% (v/v) de OADC e 0,2% (v/v) de glicerol, adicionado ou não de 25 µg/mL de canamicina (Kan - Sigma-Aldrich), para a avaliação da expressão do gene *kanR* contido no vetor de expressão pAU5. As placas foram incubadas por quatro semanas para determinação de UFC em estufa a 37°C em ambiente com 5% CO₂.

3.8 Protocolo de imunocitoquímica para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1

As amostras das células THP-1 infectadas com o BCG/*sm14* e os BCGs controles foram removidas 4, 24 e 48 h após a infecção, centrifugadas a 400 x g, lavadas três vezes com PBS e mantidas em 1mL de PBS.

Utilizando uma centrífuga citológica (Citospin modelo 2400 – Fanem, São Paulo), as células foram transferidas para lâminas de microscopia (Solidor – Médico International Trading Co, Tianjin, China) previamente tratadas com 2 % (v/v) de silano (Sigma-Aldrich) em acetona PA (Merck). De cada amostra, foram adicionados 150 µL em cada orifício seguido de centrifugação a 1800 rpm por 3 minutos.

As células foram fixadas com 4% de paraformaldeído pH 7,4 (Sigma-Aldrich), por 15 minutos, e lavadas em tampão Tris base salina (TBS) com 0,2% (v/v) de Tween20 (Merck), pH 7,4 10 mM (TBS-T) por 10 minutos. A seguir, foram adicionados 50 µL de SFB diluído em TBS-T (1:100) por 30 minutos, com o objetivo de impedir ligações inespecíficas. Após a remoção do soro, foram adicionados 50 µL

dos anticorpos monoclonais primários (Tabela 3.2) diluídos em TBS-T. As lâminas foram incubadas em câmara úmida *overnight* a 4°C.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com TBS-T (3 banhos por 5 minutos cada) e incubadas com 50 µL de anticorpo secundário biotilado (Tabela 3.1). Após 30 minutos, as lâminas foram lavadas com TBS-T em três banhos por 5 minutos cada e foram adicionados 50 µL do complexo estreptoavidina-peroxidase (Dako, Glostrup, Dinamarca) por 30 minutos em câmara úmida, lavando-se em seguida três vezes por 5 minutos cada com TBS-T. Para a revelação, foram adicionados 50 µL em cada amostra da solução de 3-3' diaminobenzidina (DAB - Dako) sendo acompanhada a conversão da tonalidade em microscópio óptico (400 x). A reação foi finalizada mergulhando as lâminas em água destilada e, posteriormente, em água corrente. A seguir, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer (Dako) por 2 minutos, e posteriormente lavadas em água corrente. Logo após, as lâminas foram desidratadas em etanol (Merck) por 10 minutos, diafanizadas em xilol (Merck) por 10 minutos e montadas em “Faramount Mounting Medium, Aqueous” (Dako) entre lamínulas (Corning).

O percentual de células, expressando as citocinas IL-10, IL-12 e TNF-α após infecção com BCG/*sm14*, BCG-P ou BCG/pAU5 por 4, 24 e 48 horas foi determinado pela contagem de células positivas em um campo de duzentas células, utilizando microscopia óptica (1000x).

Tabela 3.2: Anticorpos utilizados no protocolo de imunocitoquímica

Anticorpo Primário	Origem	Diluição	Empresa	Anticorpo Secundário
anti-IL-10 humana	Rato	1:75	Mabtech AB Nacka Strand, Suécia	Coelho anti-rato (Dako)
anti-IL-12 (p70) humana	Camundongo	1:200	Mabtech AB Nacka Strand, Suécia	Kit LSAB – anti-camundongo, anti-coelho e anti-cabra (Dako)
anti-TNF-α humana	Cabra	1:25	R&D Systems Minneapolis, USA.	Kit LSAB – anti-camundongo, anti-coelho e anti-cabra (Dako)

3.9 Protocolo de citometria de fluxo para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1

Os experimentos envolvendo a produção de citocinas em células THP-1 mediada pela infecção com BCG/*sm14* e os BCGs controles foram realizados como descrito no item 3.5. Nas amostras onde a infecção ocorreu por 24 horas e 48 horas foram adicionadas 1 μ L de brefeldina A (BD Biosciences / Becton Dickinson & Company, San Diego, EUA) 4 horas antes do término de cada tempo de infecção, atuando na inibição do complexo de Golgi por este ser o principal centro de distribuição da célula, visando o acúmulo de citocina no interior da célula.

As amostras foram ressuspensas em 50 μ L da solução *Cytofix/Cytoperm* (BD Biosciences), homogeneizadas no agitador de tubos (Fanem) e incubadas por 20 minutos em gelo. Em seguida foram adicionados 150 μ L de PBS, as amostras foram centrifugadas por 10 segundos a 6500 x *g* e ressuspensas em 200 μ L tampão *Perm/Wash* 1X (BD Biosciences) adicionado com 10% (v/v) de soro AB humano (Sigma-Aldrich). Os anticorpos (Tabela 3.2) diluídos no tampão *Perm/Wash* adicionado com 10% (v/v) de soro AB humano foram adicionados as amostras e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram lavadas uma vez com 400 μ L de *Perm/Wash* e uma vez com 400 μ L PBS.

A leitura das amostras foi realizada no citômetro Coulter EPICS XL-MCL (Beckman Coulter, Fullerton, EUA), utilizando o filtro *Band Pass* (BP) de 525 nm para a leitura dos anticorpos marcados com fluorocromo Ficoeritrina (PE) e o filtro BP de 575 nm para leitura do anticorpo marcado com fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Tabela 3.3) e analisadas no programa WinMDI versão 2.8. A seleção da região de interesse (R1) foi realizada em gráficos de distribuição em pontos de tamanho celular relativo (*Foward angle light scatter* - FSC) versus granulosidade celular (*Side angle light scatter* - SSC), de onde foram excluídos tanto restos como grumos celulares, sendo analisado um mínimo de 20 mil eventos por amostra.

Tabela 3.3: Anticorpos utilizados no protocolo de citometria de fluxo

Anticorpo Primário	Origem	Diluição	Empresa	Fluorocromo	Filtros (Band Pass)
anti-IL-10 humana	Rato	1:200	BD Biosciences	PE	575 nm
anti-IL-12 (p70) humana	Camundongo	1:200	BD Biosciences	PE	575 nm
anti-TNF- α humana	Camundongo	1:800	BD Biosciences	FITC	525 nm

4. RESULTADOS

4.1 Cultivo da célula THP-1

Para a padronização da manipulação da célula THP-1 foram determinados parâmetros para o meio de cultivo e manutenção.

4.1.1 Meios de cultivo.

Foram testados, diversos meios de cultura (MEM, D-MEM e RPMI 1640) e suplementos (SFB, HEPES, L-glutamina, NaHCO_3 , 2-mercaptoetanol, piruvato de sódio, estreptomicina/penicilina, gentamicina) e após observação morfológica das células por microscopia óptica (400 x), definiu-se que para os experimentos propostos seria utilizado o meio de cultura RPMI preparado com 0,2% (v/v) de NaHCO_3 , sendo suplementado com SFB nas concentrações de 20% para o descongelamento e 10% para a manutenção e experimentos. O uso de outros suplementos de crescimento como piruvato de sódio e 2-mercaptoetanol não se mostraram necessários (dados não mostrados).

4.1.2 Manutenção

A manutenção da célula THP-1 foi realizada a cada 3-4 dias, contudo, foi estipulado após observação morfológica, que os experimentos seriam realizados com células que estivessem na terceira ou quarta passagem (Figura 4.1). Da mesma forma, para a criação dos lotes de trabalho e reposição do acervo, as células THP-1 seriam mantidas até a oitava passagem.

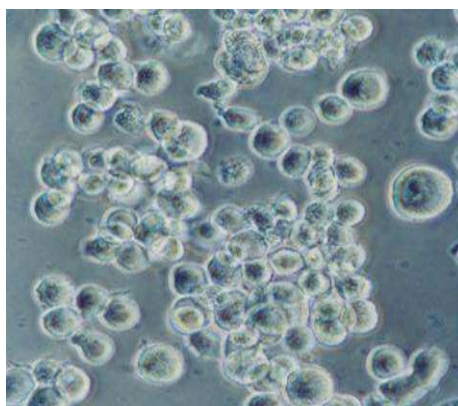


Figura 4.1 Microscopia óptica (200 x) de células THP-1, após três passagens, mantidas em meio RPMI 1640 preparado com 0,2% de NaHCO_3 e suplementado com 10% de SFB.

4.2. Cultivo das cepas de BCG

Para o cultivo das cepas BCG-P, BCG/pAU5 e BCG/sm14 foi utilizado a metodologia usualmente aplicada no LATER (Medeiros 2001, Santos 2002, Argondizzo 2005). Entretanto devido à dificuldade para a determinação da viabilidade dos BCGs em UFC utilizando o meio Middlebrook 7H10 (Difco) suplementado com 10% (v/v) de ADC preparado no laboratório, buscaram-se diferentes alternativas, como a substituição do lote do meio Middlebrook 7H10, utilização do meio Middlebrook 7H11 e suplementação dos meios com ADC e OADC comercial (Difco).

A quantificação dos BCGs obtida, em UFC, após o plaqueamento em diferentes formulações dos meios Middlebrook 7H10 e 7H11, foi confrontada com a quantificação das amostras em hemocitômetro e no ajuste ao padrão 1 do sistema de McFarland. Os resultados demonstraram que os BCGs cultivados em meio Middlebrook 7H11 preparado com 0,2% de glicerol e suplementado com 10% de OADC (Figura 4.2) obtiveram a mesma quantidade de UFC que as amostras ajustadas ao padrão 1 do sistema de McFarland e quantificadas em hemocitômetro.

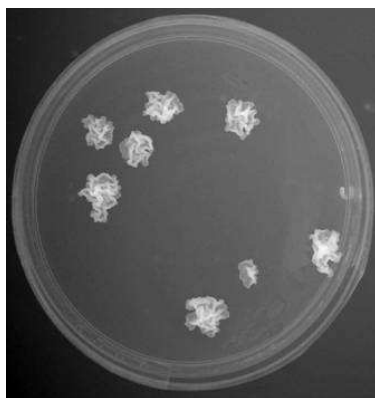


Figura 4.2 Cultura de *M. bovis* BCG Pasteur em meio 7H11 suplementado com 10% de OADC.

4.3 Expressão da proteína Sm14 pelo BCG/*sm14*

A técnica de *Western blot* foi empregada para avaliar a expressão da proteína Sm14 pelos quatro clones da construção BCG/*sm14* utilizados nos experimentos de infecção em células THP-1.

Foi utilizada como padrão (P), 20 ng da proteína Sm14r produzida em *E.coli*, gentilmente cedida pela Dr^a. Miriam Tendler (Laboratório de Esquistossomose Experimental – IOC/Fiocruz) onde em virtude do aquecimento observam-se duas bandas, referentes à proteína Sm14r e seu dímero. Nas linhas 1 a 4 foram aplicados como controle, amostras de 4 clones de BCG/pAU5, onde se observam bandas inespecíficas. Nas linhas 5 a 8 foram aplicadas amostras de 4 clones de BCG/*sm14*, destacando-se em vermelho as bandas correspondentes a proteína Sm14r produzida em BCG, sendo visualizado também o dímero dessa proteína (Figura 4.3).

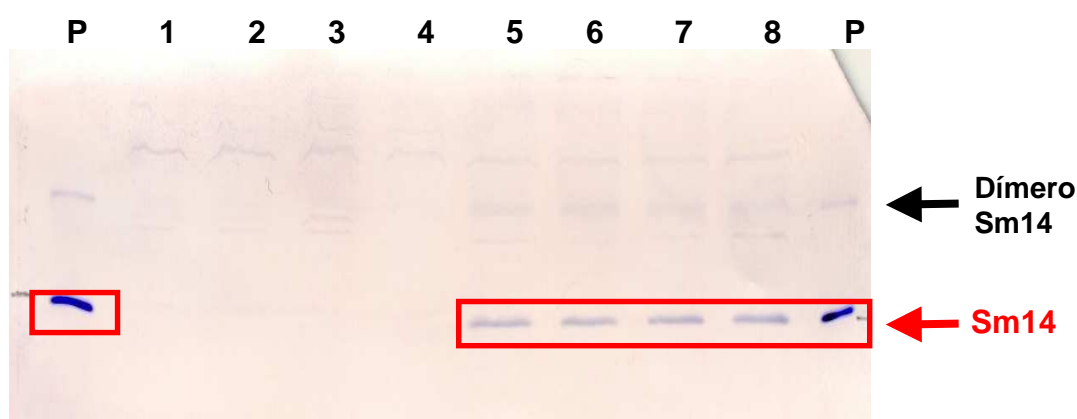


Figura 4.3 Expressão da proteína Sm14 produzida pelos quatro clones de BCG/*sm14* utilizados nos experimentos de infecção (linhas 5-8). Como controle foram usados 20 ng da proteína Sm14 (indicada pela letra P) e as proteínas totais dos quatro clones de BCG/pAU5 utilizados nos experimentos de infecção (linhas de 1-4).

4.4 Multiplicidade de infecção (MOI) BCG:THP-1

Para a determinação da melhor relação micobactéria-célula THP-1 a ser utilizada para se testar os BCG recombinantes, foi utilizada a quantificação da expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α , após 4 e 24 horas de infecção pela técnica de citometria de fluxo. Foi realizado um experimento onde foram testadas três relações micobactéria-célula THP-1: 5, 10 e 50 células de BCG-P para cada célula THP-1. Os resultados evidenciados e demonstrados na figura 4.4, indicam

que um percentual pequeno de células THP-1, mesmo sem estímulos, é capaz de secretar essas citocinas em nível basal (2,9%, 5,3%, 3,0% para IL-10, IL-12 e TNF- α , respectivamente). Estes percentuais permanecem estáveis após 4 horas de infecção com o BCG-P. Entretanto, após 24 horas de infecção com BCG-P, o percentual de células secretando IL-10 foi de 4,8%, 13,4% e 5,7% quando infectadas respectivamente por 5, 10 e 50 micobactérias-célula THP-1, indicando que para esta citocina a melhor relação micobactéria-célula THP-1 é de 10:1 (Figura 4.2). Para IL-12 foi possível observar que 4,8%; 12,7% e 6,1% das células infectadas expressavam esta citocina em resposta à mesma relação micobactéria-célula THP-1. Contudo, observamos um perfil diferente quanto à secreção de TNF- α , 10,5%, 5,97% e 4,23%, indicando que a melhor dose resposta foi obtida com a relação de 5 micobactérias-célula THP-1.

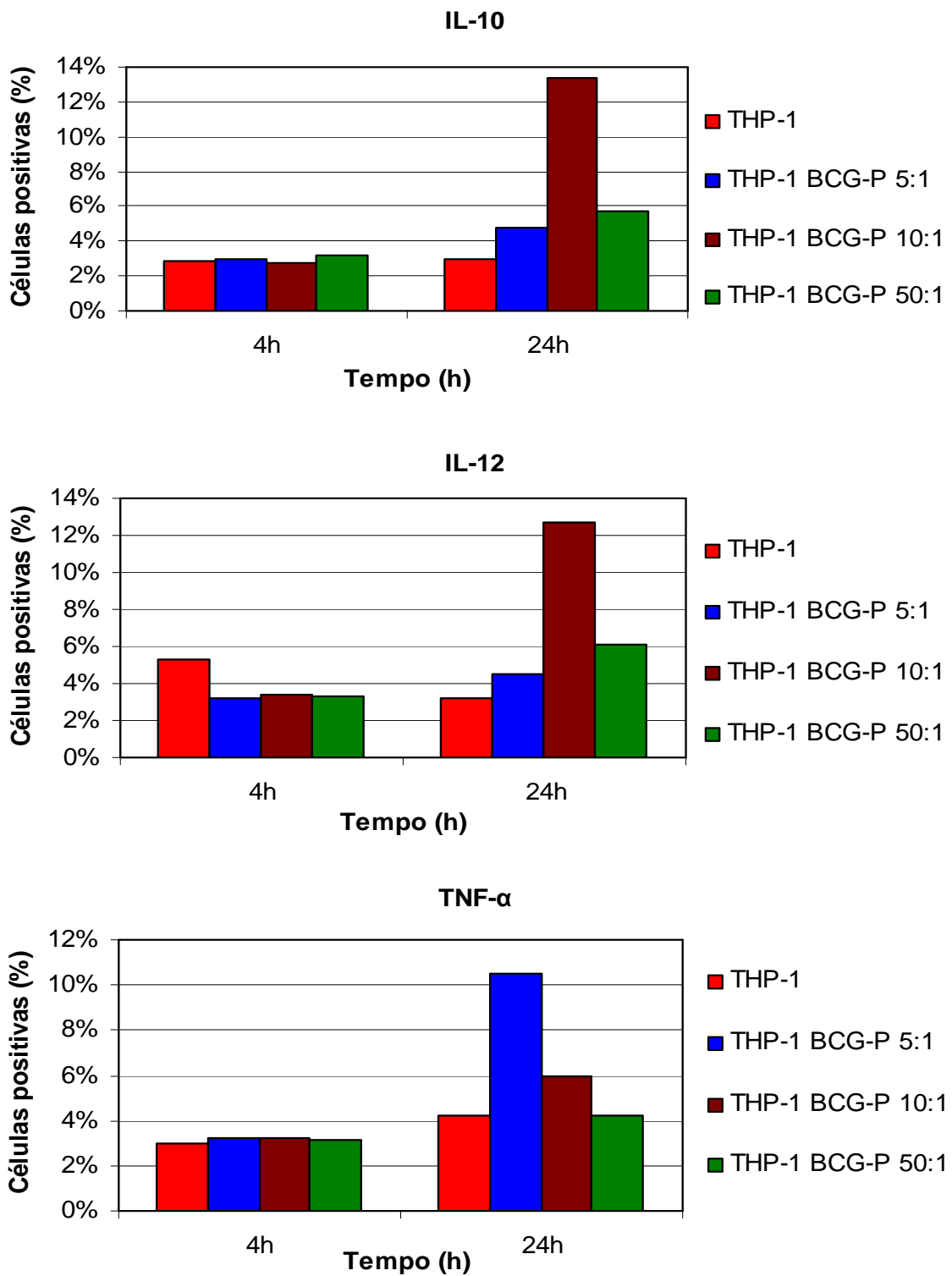


Figura 4.4. Expressão de IL-10, IL-12 e TNF- α em células THP-1 infectadas com *M. bovis* BCG sub-cepa Pasteur 1173P2 utilizando diferentes relações micobactéria-célula.

4.5 Capacidade de proliferação da célula THP-1 infectada pelo BCG/*sm14* e BCGs controles

A avaliação da capacidade de replicação das células THP-1 infectadas ou não pelo BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5) foi realizada pela técnica de proliferação celular através da absorção de timidina tritiada (cintilação). Os resultados obtidos em um experimento demonstram que as células THP-1 tiveram seu crescimento celular reduzido em mais de dois \log_{10} , 24 e 48 horas após a infecção com o BCG/*sm14* e os BCGs controles, não havendo diferença entre os BCGs. Os resultados indicam que a linhagem monocítica THP-1 tem sua diferenciação celular interrompida após infecção com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (Figura 4.5).

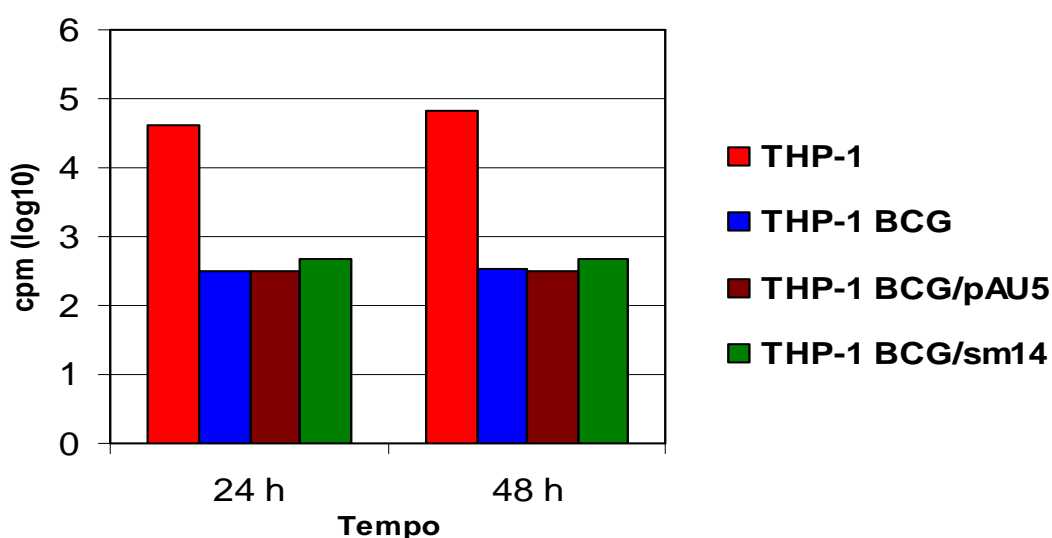


Figura 4.5: Atividade proliferativa das células THP-1 infectadas pelo BCG/*sm14* e pelos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5). Os resultados estão expressos em contagem por minuto (cpm).

4.6 Avaliação da viabilidade e estabilidade funcional (expressão do gene *kanR*) dos BCG/*sm14* e BCGs controles recuperados das células THP-1

A capacidade de infecção e manutenção do crescimento intracelular dos BCGs foi realizada em paralelo aos três experimentos de infecção com as cepas de BCG em células THP-1. A determinação comparativa das UFC dos cultivados em meio 7H11 seletivo (com canamicina – 7H11/Kan) e meio 7H11 não seletivo, permitiu avaliar a estabilidade funcional dos BCGs recombinantes (Figura 4.6).

Foi possível observar que de 3 a 7,5% dos BCGs não foram capazes de penetrar ou permanecerem aderidos a membrana das células THP-1, pois após 4 horas de infecção houve uma redução no número de bacilos utilizados para a infecção (tempo 0). Praticamente não houve diferença entre o número de bacilos recuperados entre o BCG/*sm14* e os BCGs controles, indicando que a presença do plasmídeo não alterou a capacidade dos BCGs recombinantes de penetrarem na célula.

Da mesma forma não observamos diferença entre os BCG/*sm14*, BCG-P e BCG/pAU5 quanto a capacidade de multiplicação intracelular, visto a manutenção entre o número de UFC recuperadas após 24 horas ($5,4 \log_{10}$, $5,7 \log_{10}$ e $5,4 \log_{10}$) e 48 horas ($5,3 \log_{10}$, $5,6 \log_{10}$ e $5,2 \log_{10}$). Uma redução entre 0,1 e $0,3 \log_{10}$ foi observada entre o período basal de 4 horas e após 24 e 48 horas.

Na avaliação da estabilidade funcional dos BCGs recombinantes, observamos que não houve diferença expressiva entre o cultivo dos BCG/*sm14* e BCG/pAU5 nos meios Middlebrook 7H11 e 7H11/Kan em todos os tempos avaliados. Como controle do meio seletivo, foram plaqueadas amostras de BCG, não sendo observado nenhum crescimento.

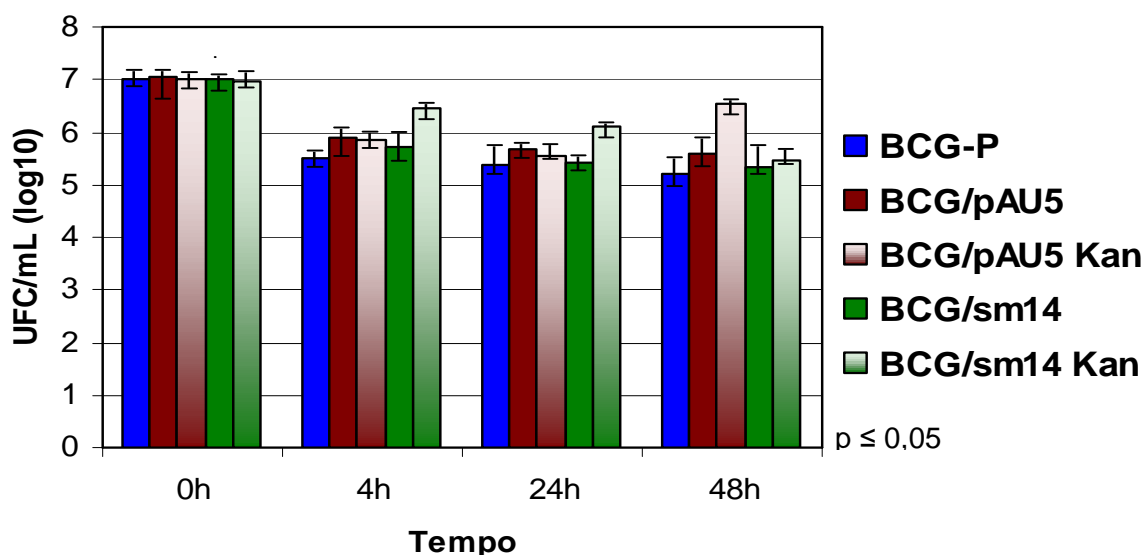


Figura 4.6 Gráfico da cinética da viabilidade do protótipo vacinal BCG/sm14 e dos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), recuperados de células THP-1 e cultivados nos meios Middlebrook 7H11 e 7H11/Kan (Três experimentos em triplicata).

4.7. Avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção do BCG/sm14 e BCGs controles em células THP-1 por imunocitoquímica

Para a detecção intracelular das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α produzidas pela infecção com BCG/sm14, BCG-P e BCG/pAU5 nas células THP-1 pela técnica de imunocitoquímica, com base na dissertação da Msc. Ana Teresa Gomes Fernandes (Fernandes 2003). Devido às dificuldades de adaptação deste procedimento à técnica de imunocitoquímica, foram avaliados diferentes parâmetros como condições de incubação dos anticorpos primários (1 hora a 25°C ou *overnight* a 4°C), tampões (HBSS, TBS-T, PBS-Saponina) e fixadores (paraformaldeído 4% ou acetona PA). Após observação morfológica por microscopia óptica (1000 x), determinou-se que os anticorpos primários deveriam ser incubados com as amostras a 4°C por 16-18 horas (*overnight*), sendo utilizado o tampão TBS-T e as amostras fixadas com paraformaldeído 4%.

Foi possível identificar por esta metodologia a produção de citocinas pelas células THP-1 (Figura 4.7). O percentual de células expressando cada citocina foi determinado após 4, 24 e 48 horas de infecção pelo BCG-P, BCG/pAU5 e BCG/sm14 através da média de três experimentos, sendo demonstrado o desvio padrão pela barra de erro. A expressão basal destas citocinas foi também determinada em células não infectadas, onde se observou que a citocina IL-10 foi

expressa por 5,0%, 10,7% e 6,4% das células THP-1, sendo que 8,8%, 8,2% e 3,4% produziram IL-12 e 3,6%, 6,5% e 2,2% expressaram TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente. Após a infecção com BCG-P, 5,9%, 6,5% e 5,5% expressavam IL-10; 9,45%, 4,6% e 6,1% expressaram IL-12 e 6,8%, 6,4% e 5,2% TNF- α , durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente. Na infecção de células THP-1 com o recombinante controle BCG/pAU5, 7,3%, 9,9% e 2,9% expressaram IL-10, na produção de IL-12 foram observados 9,9%, 8,3% e 7,1% de células e 4,1%, 5,5% e 1,5% de células produziram TNF- α . Durante a infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, foram detectadas 5,3%, 9,3% e 6,2% de células expressando IL-10; 9,4%, 10,4% e 4,3% de células produtoras de IL-12 e 4,5%; 7,1% e 6,0% de células fabricantes de TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente (Figura 4.7).

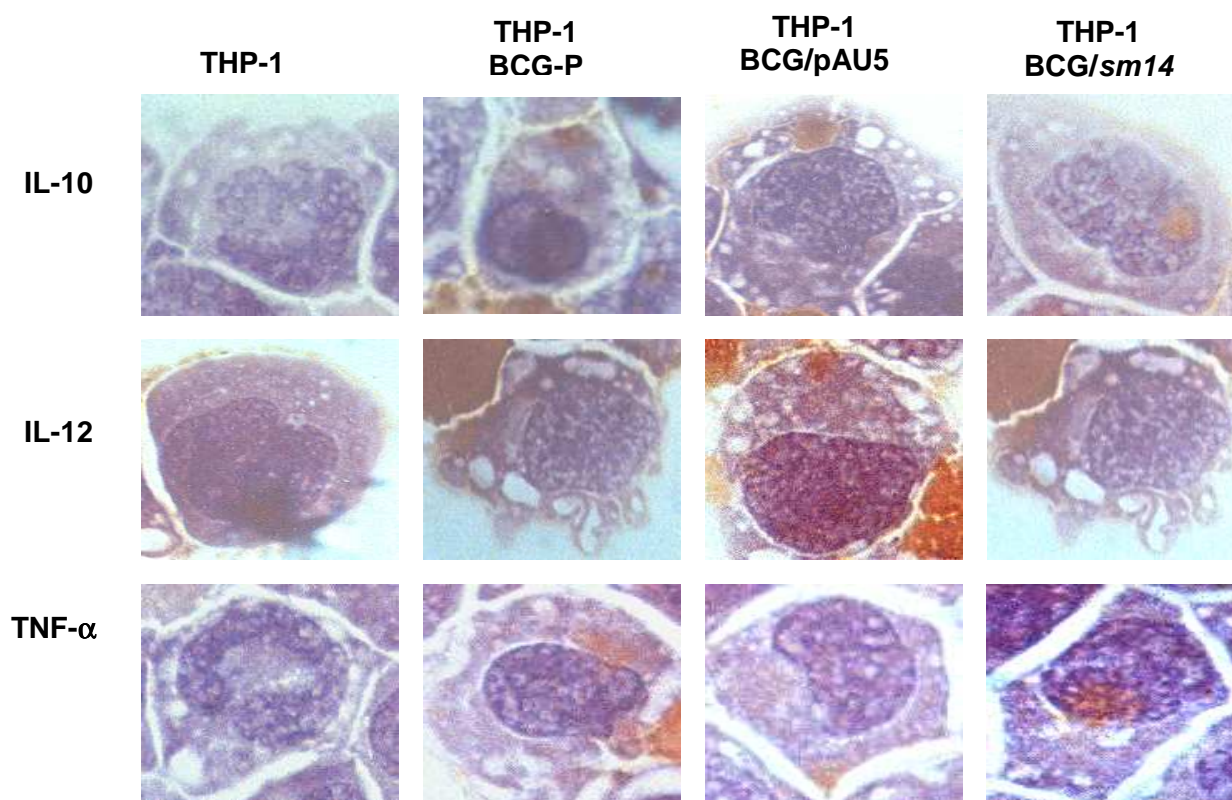


Figura 4.7 Microscopia óptica (1000 x) de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após 24 horas de infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), detectadas por imunocitoquímica.

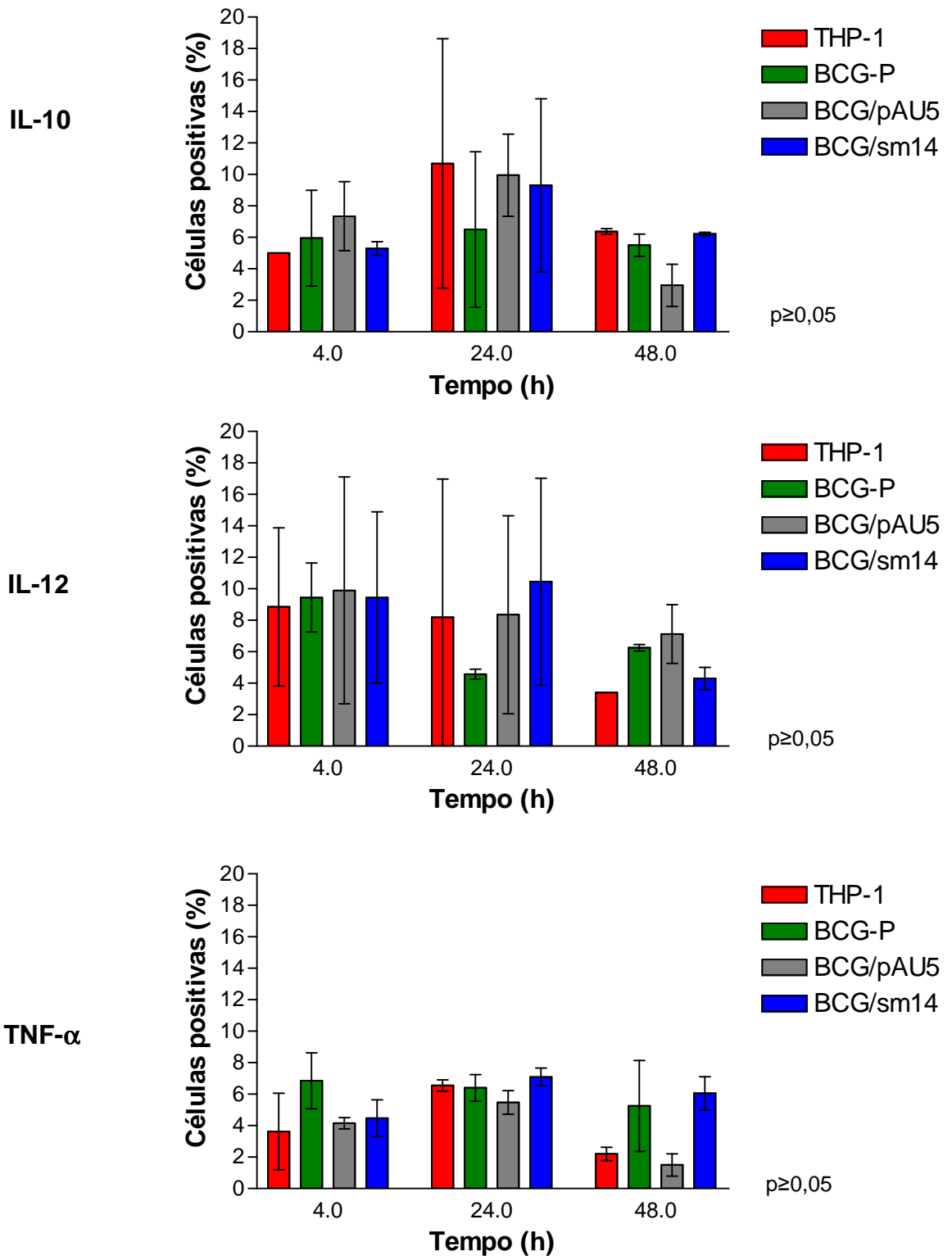


Figura 4.8 Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por imunocitoquímica (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

4.8 Avaliação das citocinas a partir da infecção do BCG/*sm14* e BCGs controles em células THP-1 por Citometria de Fluxo

Para a detecção intracelular das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α produzidas pela célula THP-1 e pela infecção com BCG/*sm14*, BCG-P ou BCG/pAU5 em células THP-1 pela técnica de citometria de fluxo, inicialmente foi determinada a região de análise a partir da leitura de uma amostra das células THP-1 incubada a 37°C em ambiente com 5% CO₂ por 4 horas, sendo comparada a relação tamanho/granulosidade, objetivando excluir tanto restos celulares quanto grumos celulares (Figura 4.8).

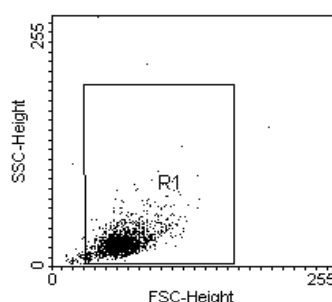


Figura 4.9 Determinação da região de análise das células THP-1 mantidas em cultivo celular. A região de análise (R1) foi determinada excluindo-se os restos celulares. Pode-se observar uma grande variabilidade quanto ao tamanho das células, visto se tratar de células em diferenciação.

Os resultados estão expressos nas figuras 4.9 a 4.12, mostrando a média de três experimentos, sendo evidenciado o desvio padrão pela barra de erro. Na detecção da produção de citocinas pelas células THP-1 sem estímulos, observou-se que a citocina IL-10 foi expressa por 3,2%, 8,1% e 11,4% das células THP-1, sendo que 2,7%, 4,6% e 8,1% das células THP-1 produziram a citocina IL-12 e 3,0%, 5,9% e 5,4% das células THP-1 expressaram TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas.

A infecção com BCG-P em células THP-1 gerou durante os tempos de infecção, 3,3%, 6,9% e 13,4% de células produtoras de IL-10; 2,0%, 5,5% e 12,0% de células expressando IL-12 e 4,2%, 5,4% e 11,4% de células sintetizando TNF- α .

Na infecção com o controle BCG/pAU5 em células THP-1, 3,3%, 6,2% e 12,3% expressaram IL-10, na produção de IL-12 foram detectados 4,3%, 4,6% e 10,2% de células e 4,0%, 3,9% e 11,3% de células produziram TNF- α .

Durante a infecção do BCG/*sm14* em células THP-1, foram detectados 3,2%, 7,9% e 12,9% de células expressando IL-10; 3,1%, 4,8% e 9,0% de células produtoras de IL-12 e 2,7%, 3,4% e 11,4% de células fabricantes de TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente.

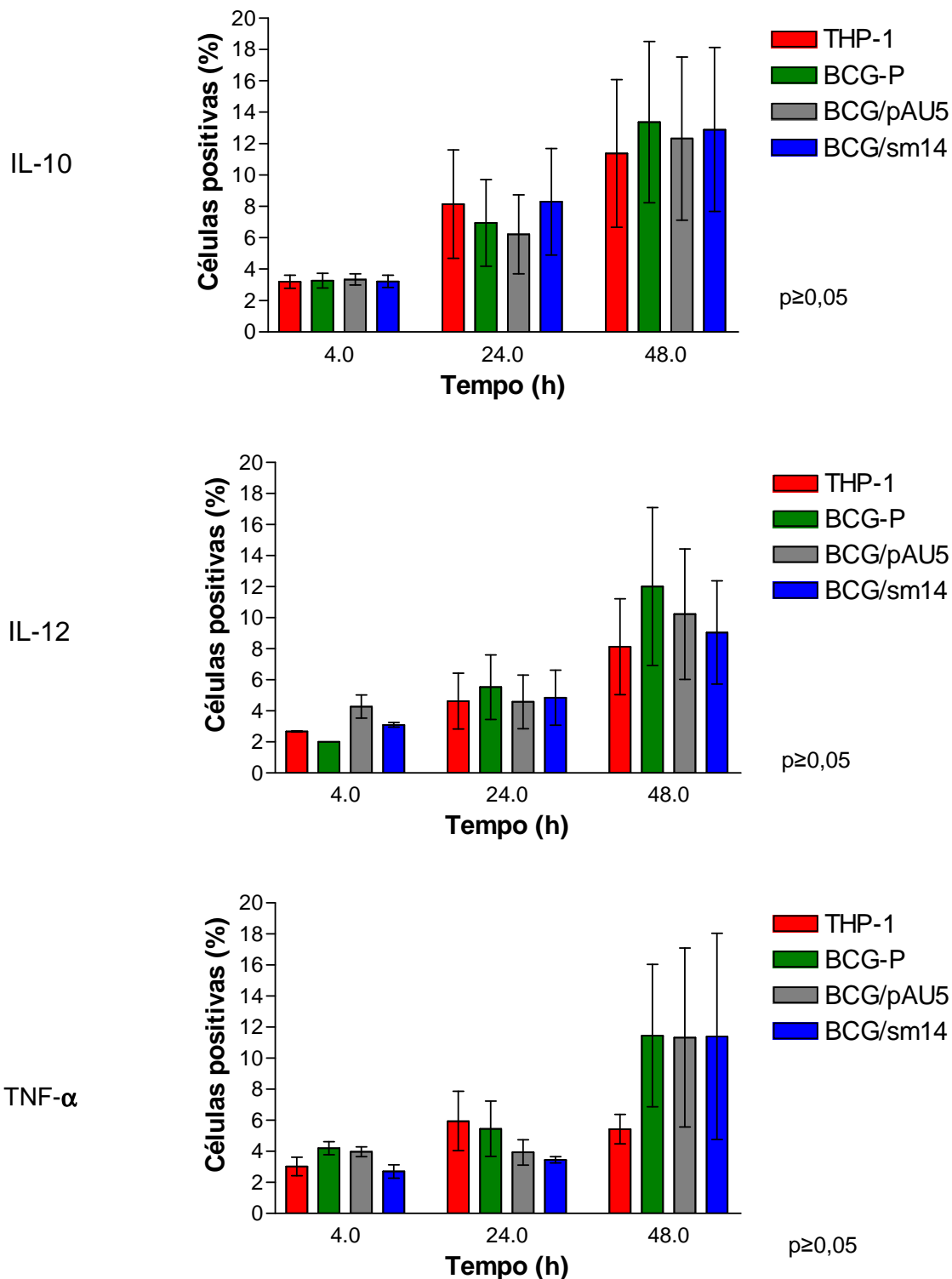


Figura 4.10: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 TNF- α e após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por citometria (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

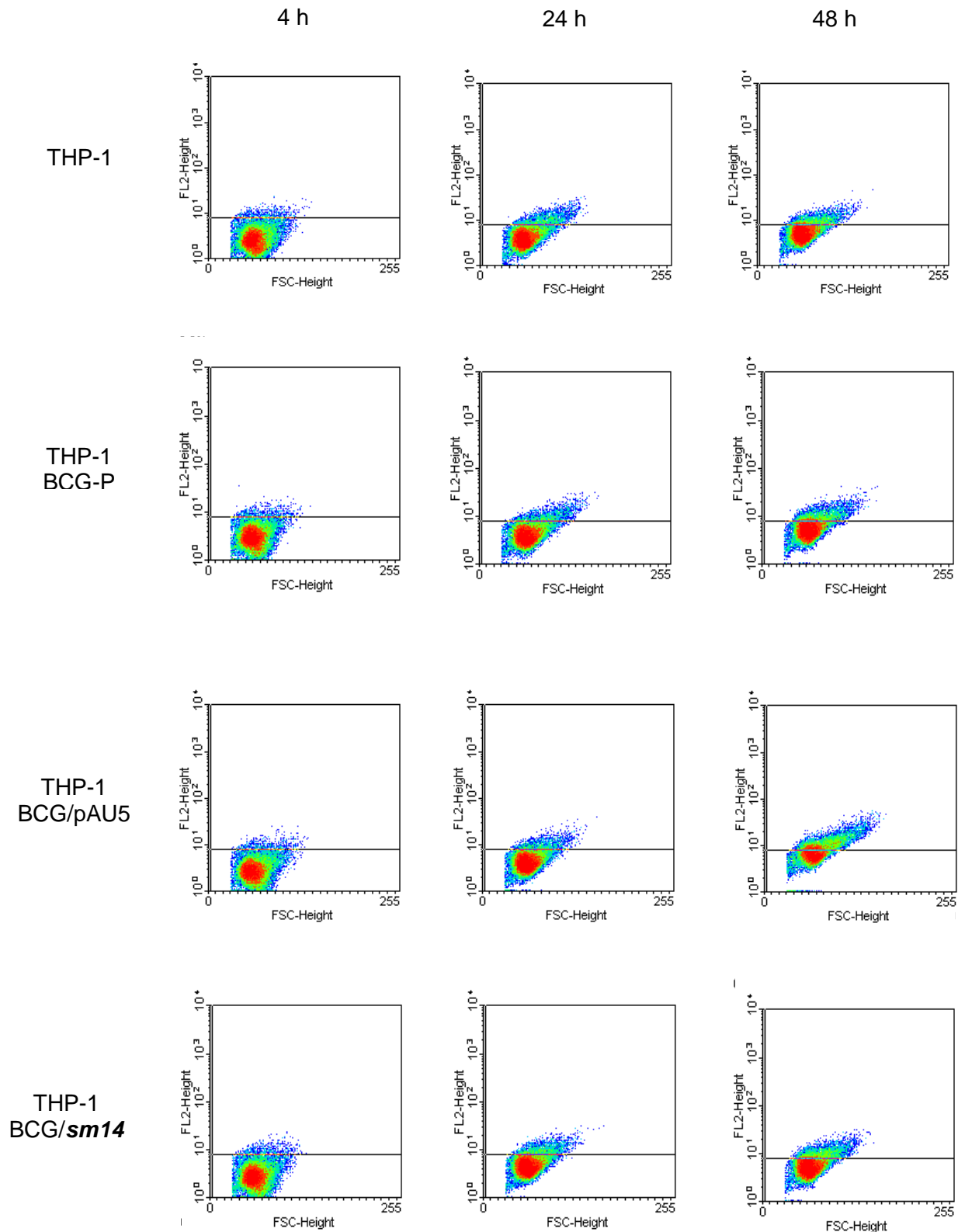


Figura 4.11: Gráfico tamanho (FSC) *versus* fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria (Experimento III).

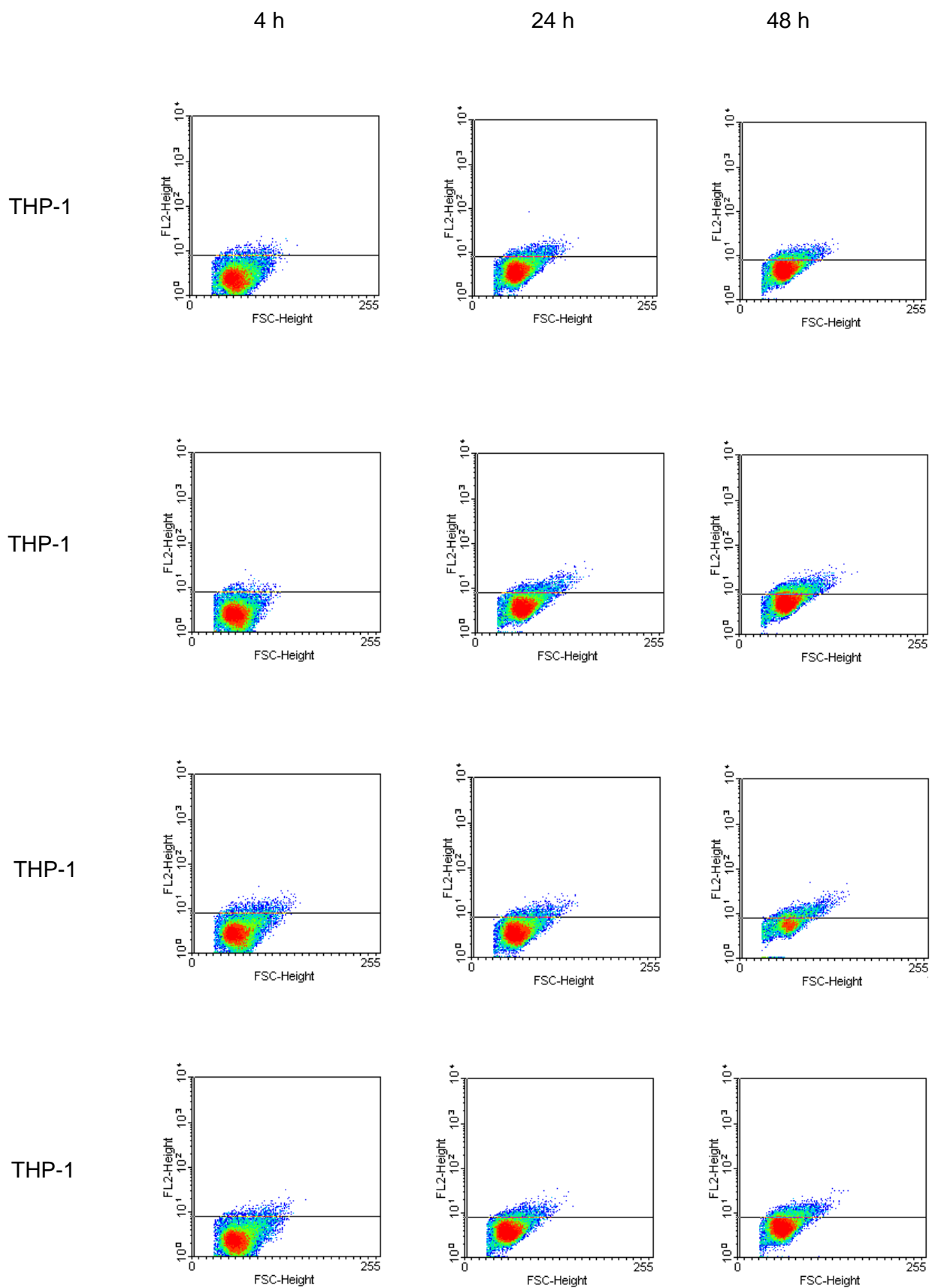


Figura 4.12: Gráfico tamanho (FSC) versus fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/sm14 e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por citometria (Experimento III).

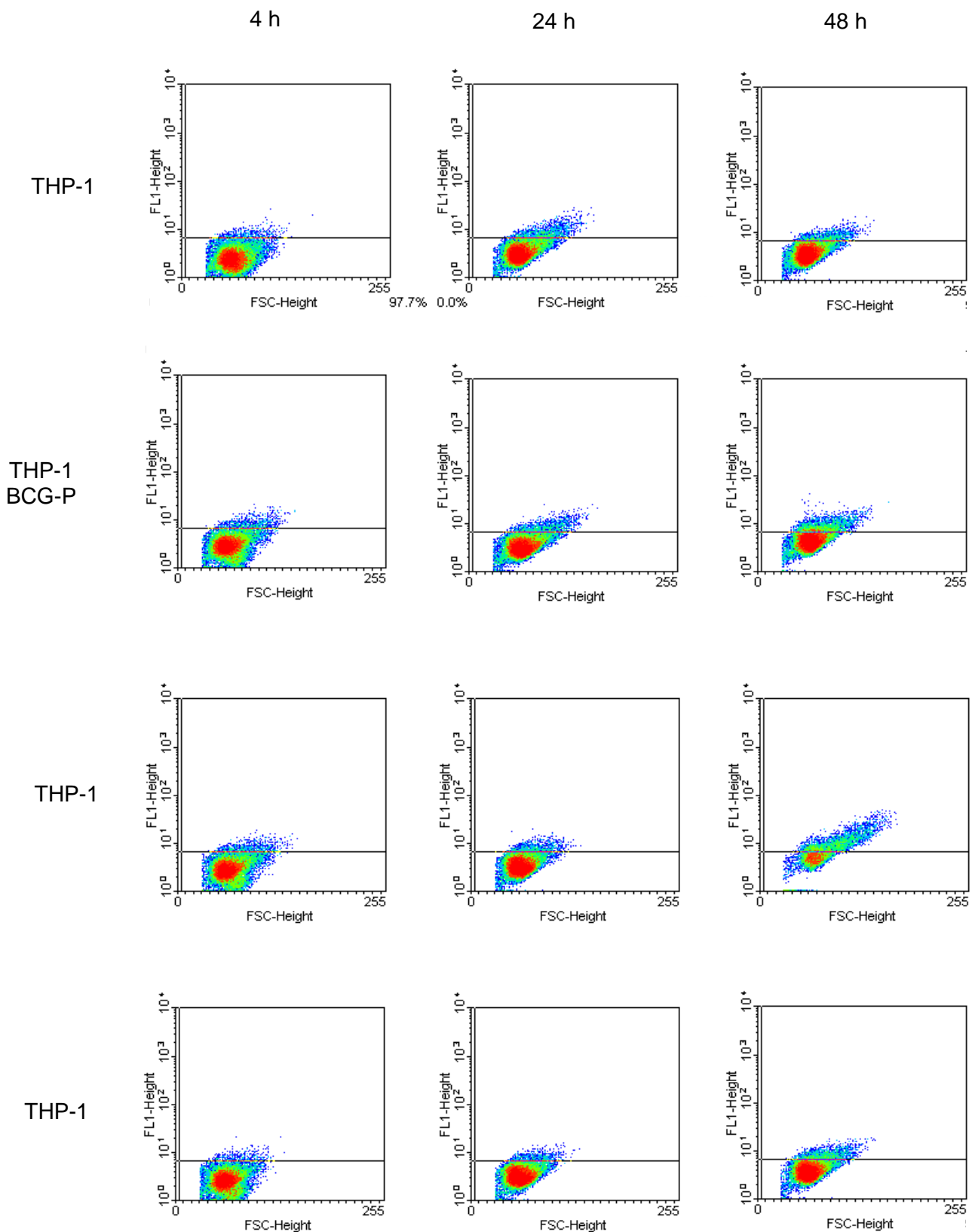


Figura 4.13: Gráfico tamanho (FSC) *versus* fluorescência (FL1 ou FL2) da avaliação de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por citometria (Experimento III).

4.9 Comparação entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo

As células THP-1 infectadas ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles foram avaliadas quanto à produção das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α durante os períodos de 4, 24 e 48 horas, pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo.

4.9.1 Detecção de IL-10

A detecção de células THP-1 produtoras de IL-10 a partir da infecção ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), estão apresentadas na figura 4.13. Nas células THP-1 não infectadas, observa-se uma variação entre 1,8% e 2,6% de células positivas na avaliação pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo nos tempos de 4 horas (5,0% e 3,2%, respectivamente) e 24 horas (8,1% e 10,7%, respectivamente), ocorrendo uma inversão na variação do número de células produtoras de IL-10, no período de 48 horas (6,4% e 11,4%, respectivamente).

Na infecção com BCG-P em células THP-1 revela-se que no período de 4 horas há variação do número de células positivas detectadas pelas duas técnicas (5,9% imunocitoquímica e 2,0% citometria). Já nos períodos de 24 e 48 horas evidencia-se uma variação de 1,0% (5,5% e 6,5%, respectivamente), sendo observado de forma similar às células THP-1 uma inversão entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (5,5% e 12,0%, respectivamente).

Na infecção com BCG/pAU5 em células THP-1 avista-se uma variação de 4,0% do número de células positivas (7,3% e 3,3%, respectivamente) em 4 horas de infecção. No tempo de 24 horas, mantém-se a variação (9,9% e 6,2% respectivamente). No entanto, no tempo de 48 horas de infecção, a porcentagem de células expressando IL-10 detectada pela técnica de imunocitoquímica diminui para 2,9% enquanto pela técnica de citometria de fluxo, aumenta praticamente quatro vezes em relação à porcentagem observada no tempo de 24 horas (12,3%).

Na infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, nos tempos de 4, 24 e 48 horas, avalia-se inicialmente uma variação de 2,1% na detecção de IL-10 pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (5,3% e 3,2%, respectivamente) no tempo de 4 horas. No tempo de 24 horas visualizamos uma pequena queda na variação dos valores obtidos entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria

(9,3% e 7,9% respectivamente). observa-se uma inversão do número de células positivas no tempo de 48 horas (6,2% e 12,9% respectivamente).

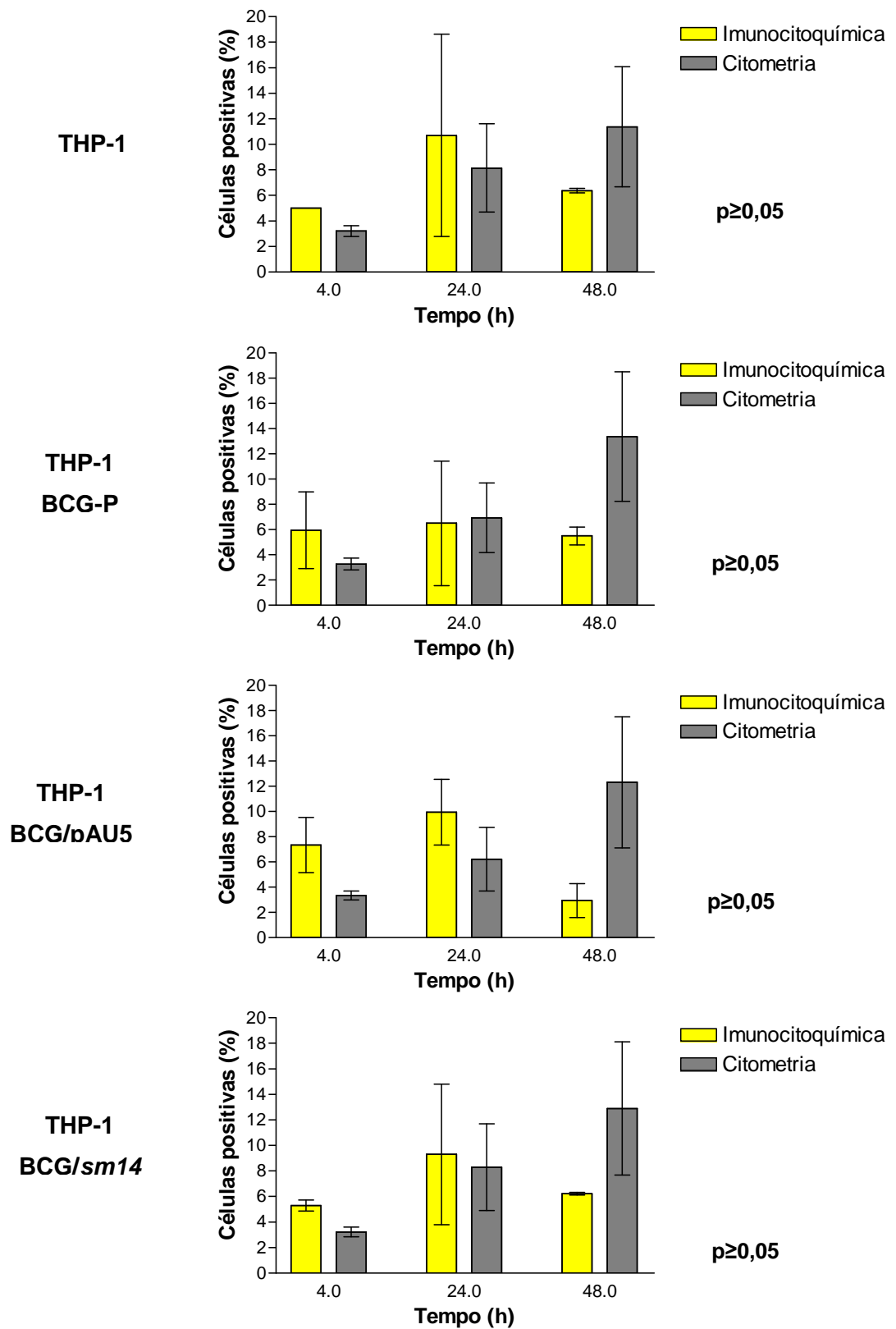


Figura 4.14: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por imunocytoquímica e citometria de fluxo (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

4.9.2 Detecção de IL-12

A detecção de células THP-1 produtoras de IL-12 a partir da infecção ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), estão apresentadas na figura 4.14. Nas células THP-1 não infectadas, observa-se uma variação na detecção de células positivas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (8,8% e 2,7%, respectivamente). No período de 24 horas, mantém-se praticamente inalterado o número de células produtoras de IL-12 avaliado pela técnica de imunocitoquímica (8,2%) e um aumento na porcentagem de células positivas avaliados pela técnica de citometria de fluxo (4,6%). No tempo de 48 horas as porcentagens de células THP-1 positivas foram de 3,4% e 8,1% nas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

Na infecção com BCG em células THP-1 revela-se que no período de 4 horas, os valores obtidos foram de 9,4% e 2,0% de células positivas identificadas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria, respectivamente. No período de 24 horas evidencia-se um decréscimo de 4,8% de células avaliadas pela técnica de imunocitoquímica (4,6%) e um aumento de 3,5% de células avaliadas pela técnica de citometria de fluxo. A mesma tendência de inversão na variação dos valores obtidos pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria no tempo de 48 horas após infecção é evidenciado (6,1% e 12,0%, respectivamente).

Na infecção com BCG/pAU5 em células THP-1 avista-se uma variação do número de células positivas detectadas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria no tempo de 4 horas (9,9% e 4,3%). Após 24 horas de infecção, ocorre uma diminuição de 1,6% do número de células positivas determinadas pela técnica de imunocitoquímica e aumento de 0,3% de células positivas avaliadas pela técnica de citometria. Já no tempo de 48 horas de infecção, a porcentagem de células expressando IL-12 detectada pela técnica de imunocitoquímica diminuiu para 7,1% e pela técnica de citometria de fluxo a porcentagem de células positivas aumentou para 10,2%.

Na infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, observa-se uma variação de mais de 6,0% na detecção de IL-12 pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (9,4% e 3,1%, respectivamente) no tempo de 4 horas. No tempo de 24 horas há um aumento de 1,0% no número de células positivas detectadas pela técnica de imunocitoquímica (10,4%) semelhante ao aumento de 1,7% detectado pela técnica de citometria de fluxo (4,8%). Em 48 horas de infecção, foram

detectados 4,3% e 9,0% de células produtoras de IL-10 pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

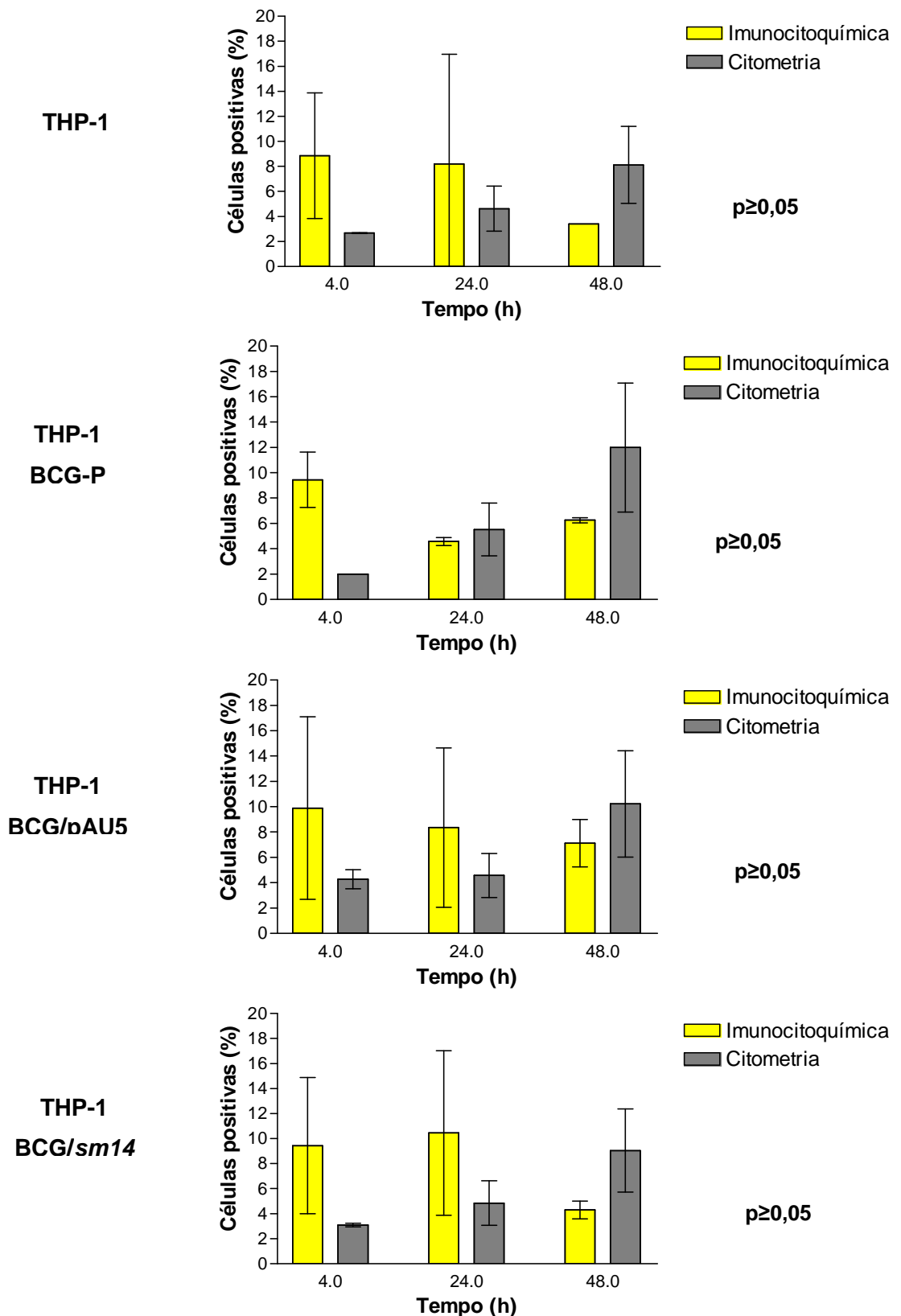


Figura 4.15: Percentagem de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

4.9.3 Detecção de TNF- α

A detecção de células THP-1 produtoras de TNF- α a partir da infecção ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), estão apresentadas na figura 4.15. Nas células THP-1 não infectadas, detecta-se no período de 4 horas os valores de 3,6% e 3,0% de células positivas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente. No tempo de 24 horas, ocorre um aumento do número de células produtoras de IL-12 avaliado tanto pela técnica de imunocitoquímica (6,5%) como pela técnica de citometria de fluxo (5,9%). No tempo de 48 horas as porcentagens de células THP-1 positivas foram de 2,2% e 5,4% nas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

Na infecção com BCG em células THP-1 revela-se que no período de 4 horas os valores detectados de células positivas pelas duas técnicas foram de 6,8% pela técnica de imunocitoquímica e 3,0% pela técnica de citometria de fluxo. Já nos períodos de 24 e 48 horas evidenciam-se 6,4% e 5,2%, respectivamente, de células positivas na leitura pela técnica de imunocitoquímica. Nesses mesmos períodos, os valores da leitura pela técnica de citometria de fluxo os valores de células produtoras de TNF- α foram semelhantes (5,9% e 5,4% respectivamente).

Na infecção com BCG/pAU5 em células THP-1 avistam-se os valores de 4,1% e 4,0% de células positivas em 4 horas de infecção pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente. No tempo de 24 horas, há um aumento do número de células expressando TNF- α detectadas pela técnica de imunocitoquímica enquanto pela citometria de fluxo o valor de células positivas mantém-se inalterado (5,5% e 3,9%, respectivamente). Já no tempo de 48 horas de infecção, a porcentagem de células expressando TNF- α detectada pela técnica de imunocitoquímica diminui para 1,5% e na técnica de citometria de fluxo aumenta consideravelmente em relação à porcentagem observada nos tempos de 4 e 24 horas (11,3%).

Na infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, nos tempos de 4, 24 e 48 horas, observa-se inicialmente os valores de 4,5% e 3,1% de células produtoras de TNF- α identificadas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo no tempo de 4 horas de infecção. No tempo de 24 horas há um aumento de células positivas detectadas em ambas as técnicas (7,1% e 4,8% respectivamente). Em 48 horas de infecção, foram detectadas 6,0% e 9,0% de células produtoras de TNF- α pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

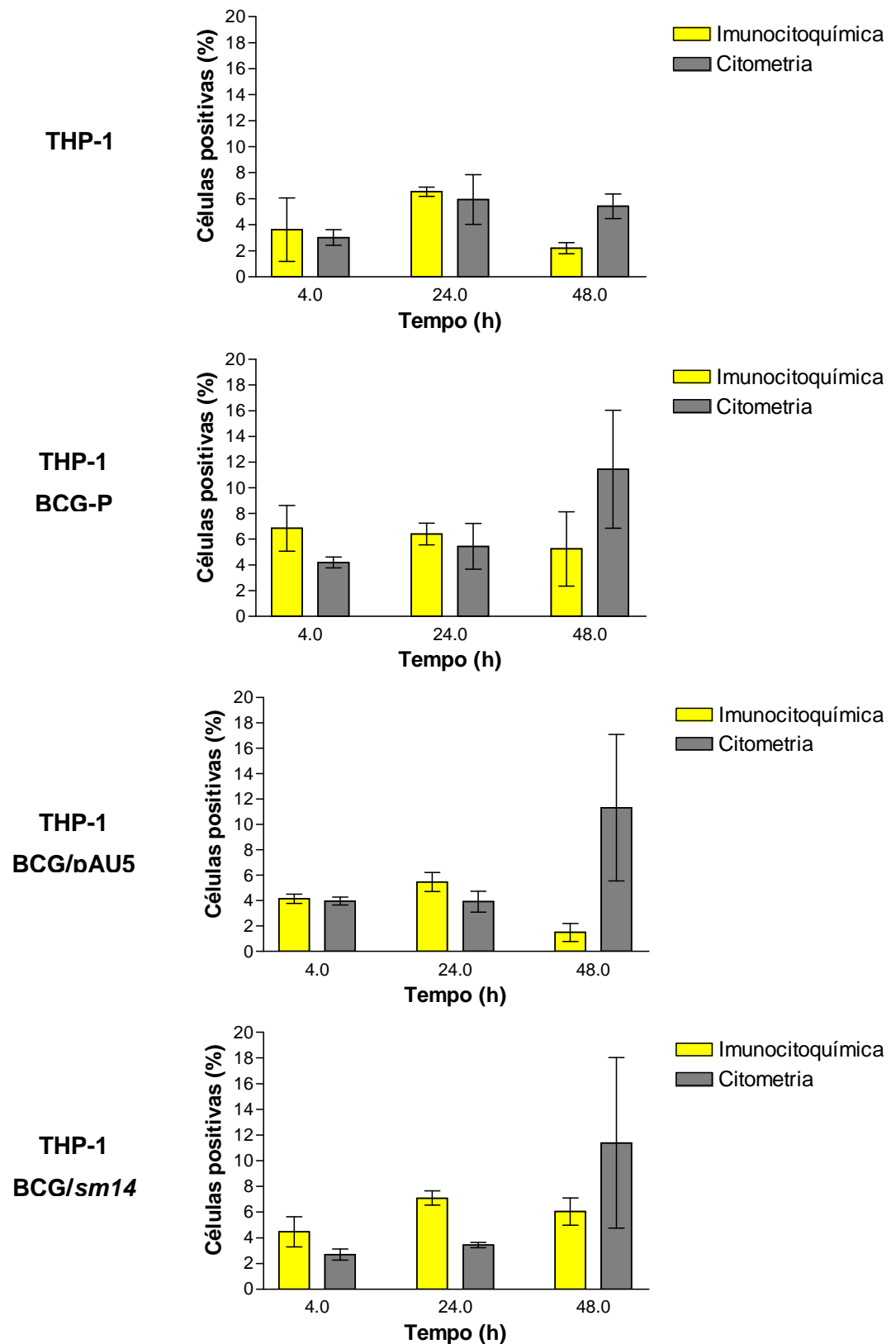


Figura 4.16: Percentagem de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

Os resultados obtidos por ambas as técnicas, apesar de divergentes entre si, não permitiram identificar diferenças no perfil de citocinas fabricadas pelas células THP-1 infectadas pelo BCG/*sm14* e pelos BCGs controles.

5. DISCUSSÃO

Devemos considerar alguns pontos importantes para se estudar a resposta imune desencadeada por protótipos vacinais, bem como sua eficácia. Dentre eles, podemos indicar a impossibilidade de se realizar experimentos em seres humanos sem prévios estudos *in vitro* em células humanas e/ou de animais e *in vivo* em animais de experimentação, apesar de sabermos que estes não reproduzem fielmente toda a gama de indução da resposta imune observado no homem (Metz *et al* 2002). Outras questões sobre o uso de animais em experimentação envolvem o benefício potencial contraposto ao sofrimento animal, aspectos legais, morais e éticos. Por estas razões um grande esforço vem sendo realizado na busca de métodos alternativos que sejam capazes de substituir, diminuir ou refinar os métodos de utilização de animais em experimentação, conforme descrito na teoria dos “3 Rs” – *Replacement* (substituição), *Refinement* (refinamento) e *Reduction* (redução) - descrita por Russell e Burch em 1959 (Dellepiane, Griffiths & Milstien 2000, Metz *et al.* 2002, Presgrave 2003).

A grande pressão internacional sobre as indústrias de fármacos, cosméticos e imunobiológicos que são grandes usuárias de animais no desenvolvimento, produção e testes de eficácia e segurança de produtos no sentido de buscarem a validação e aplicação de novas técnicas baseadas nos 3Rs, levou a criação de órgãos como o *Fund for Replacement of Animal Medical Experiments* (FRAME) que, desde 1983, edita uma revista internacional intitulada *Alternatives to Laboratory Animals* (ATLA). Em 1994, foi inaugurado o Centro Europeu para a validação de métodos alternativos (*European Centre for the Validation of Alternative Methods* - ECVAM). Outras instituições, como *Cosmetic, Toiletries and Frangrance Association* (CTFA), *Interagency Regulatory Alternatives Group* (IRAG), *Food and Drug Administration* - EUA (FDA) também atuam nos estudos de relevância e confiabilidade de propostas alternativas, pela pesquisa dos métodos atualmente utilizados e o desenvolvimento e validação de novos testes, para que os produtos químicos e os produtos de várias espécies possam ser manufaturados de forma mais segura e econômica, visando reduzir o uso e minimizar o sofrimento dos animais (Balls 2002, Hendriksen 2005).

Um dos métodos alternativos para substituição ou pelo menos diminuição do uso de animais nas fases de desenvolvimento, produção e testes de algumas vacinas é a adoção de sistemas de ensaios *in vitro*, dentre os quais podemos

destacar o uso de cultura de células (Metz *et al* 2002, Presgrave 2002, Presgrave 2003). A principal vantagem da utilização *in vitro* de cultivos celulares é o controle do ambiente de cultura, podendo-se controlar condições físico-químicas (pH, temperatura, pressão osmótica, níveis de oxigênio (O₂) e CO₂, tensão superficial) e fisiológicas (hormônios, fatores de crescimento, densidade celular), que podem ser mantidas relativamente constantes (Doyle & Griffiths 1998, Freshney 2000a). Outras vantagens relevantes são: a homogeneidade das células em cultivo em relação à morfologia e especificidades uniformes, podendo com facilidade obter um número elevado de réplicas idênticas, superando assim o problema de heterogeneidade de amostras, reduzindo a variação e o custo dos experimentos, possibilitando a realização de múltiplos testes com muitas variáveis (Doyle & Griffiths 1998, Freshney 2000a).

A técnica de cultura de células integrada com sistemas computacionais e a hierarquização de métodos podem ser ferramentas importantes para etapas do desenvolvimento de protótipos vacinais (Figura 5.1), sendo utilizada principalmente para procedimentos de seleção (*screening*) de vacinas candidatas na fase pré-clínica (Henriques & Sampaio 2002, Larsen 2005).

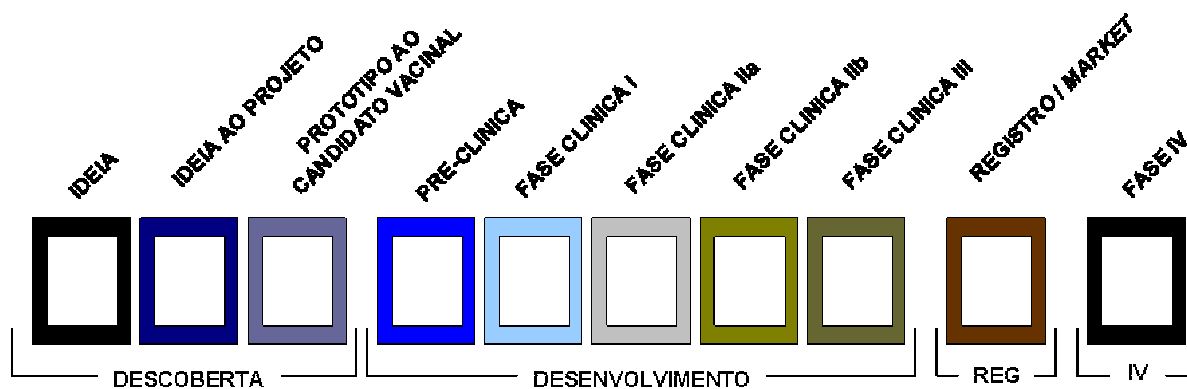


Figura 5.1: Modelo esquemático das etapas necessárias para implantação de novos fármacos e imunobiológicos (Adaptado de Larsen 2005).

Este estudo visou o desenvolvimento de um protocolo para a seleção de protótipos vacinais utilizando como modelo *M. bovis* BCG sub-cepça Pasteur expressando o antígeno Sm14 de *Schistosoma mansoni* e a linhagem de monócitos humanos THP-1 como substrato celular. Contudo, a eficiência da resposta imune induzida por BCGs recombinantes é dependente da capacidade de expressão da proteína heteróloga, uma vez que essa expressão pode interferir na

ativação celular. Assim, confirmamos a expressão da proteína Sm14 por todos os clones do protótipo vacinal BCG/*sm14*, e nossos resultados corroboram com relatos anteriores Argondizzo (2005), utilizando o mesmo sistema de expressão. Desta forma, assumimos que todos os recombinantes BCG/*sm14* estavam expressando a proteína de interesse em quantidade suficiente para o prosseguimento dos experimentos de infecção com os protótipos vacinais em linhagens monocíticas.

Para a realização dos ensaios de infecção de células THP-1 com o BCG/*sm14*, foi necessário determinar a MOI capaz de induzir a melhor dose resposta para a expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α . Assim sendo, foram avaliadas três diferentes relações, 5, 10 e 50 BCGs para cada célula THP-1. Os resultados obtidos mostram que o fato da MOI de 50 BCG:THP-1 não ter estimulado adequadamente a expressão de citocinas, sugere que esta concentração de BCG promove perda da viabilidade de células THP-1 (Hassan *et al* 2006). Por outro lado, a MOI de 10 de BCG/THP-1 estimula uma maior porcentagem de células produtoras de IL-10 e IL-12, tendo sido considerada, portanto a melhor dose-resposta para a síntese das citocinas neste estudo. Entretanto, ao contrário do observado por Oliveira, Charlab & Pessolani (2001), que na análise das MOI de 1, 10 e 100 de BCG e *M. leprae* para cada célula THP-1, concluíram que a relação de 10:1 de micobactérias-célula THP-1 induz uma maior produção de TNF- α , no presente trabalho a MOI de 5 BCGs apresentou o melhor resultado com relação às células produtoras de TNF- α . Atkinson e colaboradores (2000), realizaram de forma semelhante uma pesquisa do perfil de citocinas (IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α) expressas por linhagem primária de macrófagos humanos infectadas com MOI de 0,2, 1 e 5 BCGs, concluindo que a MOI de 5 BCG/célula induz de forma eficiente a expressão das citocinas IL-10 e TNF- α por macrófagos infectados. Devido a divergências entre os resultados obtidos neste trabalho e os resultados relatados na literatura para determinar a relação padrão para avaliação de citocinas a partir da interação BCG-macrófago, e como o maior percentual de células expressando IL-10 e IL-12 foi atingido com a relação de 10 BCG para cada célula THP-1, optamos por usar esta proporção nos ensaios de imunocitoquímica e citometria para a quantificação das células produtoras de citocinas infectadas com o protótipo vacinal BCG/*sm14*.

Dentre os requerimentos para se determinar o sucesso de protótipos vacinais está a indução e ativação das APCs, que irão realizar o processamento de antígenos, a expressão de fatores co-estimulatórios, secreção de citocinas e a

apresentação antigênica às células T, tornando-se essenciais para o desencadeamento da resposta imune (Ada 2004). Neste contexto, utilizamos uma linhagem de monócitos humanos como modelo para infecção, recuperação e análise do perfil de citocinas (IL-10, IL-12 e TNF- α) expressas em células THP-1 após infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14*. Vários autores têm utilizado esta linhagem celular como modelo de averiguação do perfil de ativação celular em monócitos (Diaz-Silvestre *et al.* 2005, Xia *et al.* 2005, Ciabattini *et al.* 2006) ou células maduras – macrófagos (Oliveira, Charlab & Pessolani 2001, Lewis *et al.* 2003, Theus, Cave & Eisenach 2004, Theus, Cave & Eisenach 2005, Hasan *et al.* 2006).

Da mesma forma, autores como Takahashi (2003), Ada (2004) e Plotkin (2005a), destacam que o reconhecimento e a ativação das APCs podem ser considerados como etapas relevantes para avaliação de protótipos vacinais e para o sucesso vacinal. Os monócitos são importantes células efetoras capazes de responder rapidamente a estímulos imunes de diferentes formas, como produção de proteínas inflamatórias, expressão de moléculas de adesão em sua superfície, ativação e diferenciação em macrófagos. Neste contexto, utilizamos a cintilografia para o acompanhamento da proliferação da célula THP-1 infectada ou não com o protótipo vacinal BCG/*sm14*, com a amostra vacinal de BCG Pasteur e com a construção BCG/pAU5. A medição de partículas beta emitidas pela timidina-H³ captada pelas células THP-1, nos permite determinar a capacidade do protótipo vacinal de ativar as células THP-1 e modificar seu estado de célula jovem, indiferenciada (monócitos) e transformá-las em células ativadas (macrófagos), a partir da redução de sua capacidade de replicação (Bennett *et al.* 1993). Nas condições avaliadas, nossos resultados mostram que as amostras de BCGs utilizadas para infectar as células THP-1 foram capazes de estimular esta linhagem, não sendo evidenciada diferenças no perfil de ativação induzido pela amostra vacinal de BCG, o protótipo vacinal BCG/*sm14* e a construção BCG/pAU5. Como a ativação dos monócitos/macrófagos não é específica, não podemos determinar o “quanto” a proteína Sm14 foi responsável pela diferenciação celular. Experimentos futuros devem ser desenhados para determinar neste sistema a capacidade de ativação da proteína Sm14.

Além da avaliação da proliferação de células THP-1, autores como Medeiros (2001), Varaldo e colaboradores (2004) e Argondizzo (2005), assinalaram a necessidade de avaliarmos a capacidade de infecção e a manutenção do

crescimento intracelular de protótipos vacinais baseados na tecnologia do BCG recombinante em culturas de monócito/macrófago. Com esse objetivo, montamos um experimento para acompanhar a cinética de crescimento do BCG/*sm14*, em paralelo com os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5) empregados na infecção e na recuperação em células THP-1, nos tempos de 4, 24 e 48 horas. Nossos dados assemelham-se com os descritos na literatura (Medeiros 2001, Varaldo *et al.* 2004, Argondizzo 2005), não detectando diferenças significativas na capacidade de infecção e de crescimento intracelular entre as amostras de BCG testadas, sendo visualizada uma pequena redução do número de UFC recuperadas entre o período basal de 4 horas e após 24 e 48 horas. Podemos concluir que nas condições estudadas o protótipo vacinal BCG/*sm14* possui a mesma aptidão de infecção e persistência intracelular da amostra vacinal BCG Pasteur e da construção BCG/pAU5, favorecendo seu uso como protótipo vacinal.

Devido à problemática da estabilidade de plasmídeos recombinantes, a qual interfere fundamentalmente com a expressão da proteína heteróloga por vacinas recombinantes baseadas em vetores vivos atenuados e, evidentemente, na plataforma do BCG recombinante (Haeseleer 1994), realizou-se a avaliação da estabilidade funcional do BCG transformado com o plasmídeo pAU5-*sm14* (BCG/*sm14*). A capacidade dos BCGs recombinantes (BCG/*sm14* e BCG/pAU5) de manterem o fenótipo de resistência para canamicina (Kan), mostra que não há diferença expressiva entre os BCGs recombinantes cultivados nos meios seletivo (7H11+Kan) e não seletivo (7H11). Esses resultados confirmam os dados obtidos no trabalho realizado por Argondizzo (2005) e são extremamente importantes para o desenvolvimento de vacinas baseada na utilização do BCG como vetor vivo atenuado de imunógenos, porque demonstram que BCGs recombinantes permanecem estáveis e expressando continuamente o gene inserido mesmo no ambiente intracelular de macrófagos (Medeiros 2001, Argondizzo 2005).

Recentemente Chabalgoity e colaboradores (2007) descrevem a importância da indução de citocinas para o desenvolvimento de uma resposta protetora para o desenho de vacinas. Visando obter dados preliminares que permitam demonstrar a viabilidade da seleção *in vitro* de vacinas, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar a possibilidade de se determinar o perfil de citocinas induzidas por protótipos vacinais em linhagem de células humanas.

As citocinas são consistentemente avaliadas e quantificadas durante testes pré-clínicos e clínicos, como marcadores de ativação e/ou supressão da resposta

imune induzida pelos protótipos vacinais. Nessa conjuntura, foi realizada a análise das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α expressas pela infecção com protótipo vacinal BCG/*sm14*, com a amostra vacinal de BCG Pasteur e com a construção BCG/pAU5 em células THP-1. Para a detecção intracelular de citocinas em células, utilizamos a técnica de imunocitoquímica (Santiago 2003) e a técnica de citometria (Kallás 1999).

A produção de citocinas induzidas pelo BCG em células mononucleares periféricas humanas segue uma cinética (Sander *et al.* 1995) que varia de indivíduo para indivíduo e tende a ser mediada por um perfil Th1 nos primeiros 5 a 7 dias, regredindo e assumindo perfil Th2 posteriormente (9 a 12 dias após a infecção). Contudo, estes autores não diferenciaram a produção de IL-10 pelos monócitos/macrófagos e linfócitos T. Mas a detecção de IL-10 foi identificada somente após 10 dias de infecção, o que contradiz nossos resultados e os de Atkinson e colaboradores (2000). Uma possível explicação pode estar na metodologia utilizada, na utilização de células não estimuladas e na obtenção destas células de indivíduos não expostos a micobactérias ou não vacinados pelo BCG. Sander e colaboradores (1995) utilizaram a técnica de imunofluorescência indireta e observação microscópica, enquanto Atkinson e colaboradores (2000) utilizaram macrófagos derivados de monócitos humanos. Em nosso sistema, a secreção de IL-10 é evidenciada em células THP-1 sem prévia ativação após 4 horas de incubação, da mesma forma após 24 horas observamos resultados similares aos descritos por Atkinson e colaboradores (2000) em macrófagos derivados de monócitos (*Monocyte-derived macrophage* – MDM). De modo interessante estes autores evidenciaram uma grande variabilidade na secreção de citocinas por MDM humanos, neste caso variando de 1,0 a 7,0% de células positivas para IL-10 após 20 horas de infecção. Observamos uma diferença entre nossos resultados obtidos pelas duas técnicas (imunocitoquímica e citometria), variando de 6,4% a 11,4%, respectivamente.

Quanto a secreção de IL-12 evidenciamos que as células THP-1 produzem, mesmo sem estímulos valores entre 2,7% e 8,8%, contudo Ciabattini e colaboradores (2006) descrevem a expressão de níveis basais de IL-12 em células mononucleares humanas (Ciabattini *et al.* 2006; 1 a 3%). O perfil de expressão de IL-12 expresso pelas células THP-1 não pode ser claramente identificado pela discrepância entre as duas metodologias utilizadas por nós, ou seja, a técnica de imunocitoquímica mostrou que 8,8% das células expressavam IL-12, enquanto que por citometria identificamos 2,7% de células positivas. Contudo após infecção pelo BCG foi observado um percentual que variou de 4,6% a 6,5% após 24 horas e 6,1 a

12,0% após 48 horas, indicando um aumento progressivo de células produtoras de IL-12. A infecção pelo BCG/sm14 também foi capaz de induzir percentuais semelhantes de células produtoras de IL-12.

Independente da metodologia utilizada, as infecções por BCG e BCG/sm14 induziram um percentual ligeiramente maior de células expressando IL-10 do que IL-12. Este perfil parece ser característico das células THP-1, e a infecção com BCG/sm14 não foi capaz de modificar esse perfil.

Uma análise mais longa, estudando a associação entre o BCG e as células THP-1 pode responder se a indução tardia destas citocinas pode ser modificada, visto não termos evidenciado esta mudança em culturas de até dois dias de interação.

Uma das maiores dificuldades para o desenvolvimento de uma vacina contra esquistossomose está a complexidade da interação entre patógeno e hospedeiro. As cercárias, os vermes adultos e os diferentes estágios de desenvolvimento entre estas formas apresentam mecanismos que permitem a estes evadir de uma resposta imune efetiva, incluindo a produção de moléculas antiinflamatórias, a inibição da migração de células apresentadoras de antígeno e a cobertura da superfície do parasito com moléculas do hospedeiro (Lebens *et al.* 2004). Outro ponto importante é o pouco entendimento da natureza da resposta imune protetora (Wynn & Hoffmann 2000, Pearce & McDonald 2002, Lebens *et al.* 2004).

Alguns autores demonstraram que em modelo murino e humano, a resposta Th2 seria eficaz para o controle da doença, ao passo que estudos de vacinação em camundongos indicam que uma imunidade mediada por células T, envolvendo a produção de IFN- γ e IL-12 (Th1), poderia ser melhor (Capron *et al.* 1995, Wynn & Hoffmann 2000). No entanto, a questão da resposta imune efetiva contra esquistossomose ainda é bastante polêmica. Existem autores que acreditam ser a resposta imune humoral a mais eficaz para a proteção de humanos e outros defendem a resposta imune celular, mas existem, também, aqueles que acreditam que ambas as respostas humoral e celular são imprescindíveis para a proteção (Brito *et al.* 2000, Ribeiro de Jesus *et al.* 2000, Varaldo *et al.* 2004). Estudos imunológicos em pessoas residentes em zonas endêmicas para esquistossomose, demonstraram altos níveis de IgE e IFN- γ , sugerindo a participação das respostas celular e humoral nos mecanismos imunológicos de resistência natural a reinfeção de *S. mansoni* (Ribeiro de Jesus *et al.* 2000). O estudo realizado por Brito e colaboradores (2000) na avaliação das respostas imunes frente à proteína Sm14 em

grupos de pessoas residentes em zonas endêmicas de esquistossomose e de pacientes crônicos e tratados para a doença, em relação à avaliação das citocinas produzidas, os níveis de IL-5 e IL-10, conhecidas como citocinas Th2, não foram estatisticamente diferentes em nenhum dos grupos estudados. Já o IFN- γ e TNF- α foram produzidos em quantidades significativamente maiores pelas PBMC de indivíduos normais endêmicos. Adicionalmente demonstraram que a IL-10 é uma importante citocina moduladora de respostas de células T na esquistossomose crônica, enquanto que a proliferação de linfócitos no grupo resistente não infectado é dependente de IFN- γ . Estes resultados sugerem que a resposta imune do tipo Th1 induzida em indivíduos normais endêmicos para um antígeno de esquistossomo poderia estar associada com resistência à infecção e também destacou a importância da Sm14 como potencial candidato vacinal contra esquistossomose humana (Brito *et al.* 2000).

Uma possível justificativa para nossos resultados seria o fato da proteína Sm14 ser expressa no citoplasma do BCG aliado a persistência intracelular BCG/*sm14* em células THP-1, não estando assim, disponível para a estimulação dos macrófagos. Nesse caso a apresentação do antígeno de interesse (Sm14) só acontece quando a Sm14 é liberada do fagossomo após a destruição do BCG (Kaufmann & Hess 1999). Dados obtidos por Varaldo e colaboradores (2004) e Argondizzo (2005), demonstram que não foram detectados anticorpos anti-Sm14 em camundongos imunizados com cepas recombinantes de BCG/*sm14*. Todavia vários autores já demonstraram, não somente a expressão de diversos antígenos no citoplasma de BCG recombinantes, como também conseguiram induzir uma eficiente resposta imune humoral, independente do sistema de apresentação no qual o antígeno alvo estava sendo expresso (Aldovini & Young 1991, Murray *et al.* 1992, Stover *et al.* 1991, Kremer *et al.* 1998, Hayward *et al.* 1999; da Cruz *et al.* 2002).

Os resultados obtidos não foram capazes de diferenciar o protótipo vacinal BCG/*sm14*, da amostra vacinal BCG Pasteur e da construção BCG/pAU5, não servindo, portanto, como comparativo aos trabalhos descritos para a determinação do perfil de citocinas obtidas nas respostas imunes contra o BCG e contra a proteína Sm14.

6. CONCLUSÕES

- Desenvolveu-se um protocolo de infecção com BCGs em células THP-1, determinando que a melhor relação foi de 10 BCGs para cada célula THP-1.
- A expressão da proteína recombinante Sm14 sintetizada pelos clones de BCG/*sm14* demonstrou-se satisfatória para realização dos experimentos de infecção em células THP-1
- O protótipo vacinal BCG/*sm14* manteve o mesmo grau de infecciosidade e persistência intracelular da sub-cepa vacinal BCG Pasteur.
- O protótipo vacinal BCG/*sm14* manteve a mesma capacidade de induzir a diferenciação e a maturação de macrófagos provenientes da linhagem de monócitos THP-1 que a sub-cepa vacinal BCG Pasteur.
- O protótipo vacinal BCG/*sm14* não foi capaz de modificar o perfil de IL-10, IL-12 e TNF- α induzido pela sub-cepa vacinal BCG Pasteur em células THP-1

7. PERSPECTIVAS

- Como a indução da resposta imune ao *Schistosoma mansoni* é preferencialmente induzida por resposta Th2 (aumento de IL-10 e diminuição de IL-12, IFN- γ e IL-2), a utilização do recombinante BCG/*sm14* como protótipo vacinal pode ser de relevância para a indução de resposta protetora para a esquistossomose, como para a tuberculose, visto que não houve diferença marcante na produção de IL-10 e/ou IL-12.
- Novos experimentos devem ser realizados para determinar o papel das células apresentadoras de antígenos na modulação de células T CD4 e CD8 visando um melhor entendimento da resposta imune adaptativa e de memória.
- A modulação das células apresentadoras de antígenos (monócitos, macrófagos, células dendríticas) pode direcionar a resposta imune a protótipos vacinais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK & Lichtman AH. **Imunologia celular e molecular**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005a. Cap.11: Citocinas. p. 251–282.

_____. **Imunologia celular e molecular**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005b. Cap.12: Imunidade inata. p. 283–306.

Ada G. The immunology of vaccination. **In:** Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines**. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2004. p. 31–46

_____. **Vaccines and vaccination**. N Engl J Med. 2001; 345 (14): 1042–1053

Al-Sherbiny M, Osman A, Barakat R, El Morshedy H, Bergquist R, Olds R. **In vitro cellular and humoral responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens**. Acta Trop. 2003; 88 (2): 117-130.

Aldovini A & Young RA. **Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-mv vaccines**. Nature. 1991; 351: 479–482

Amadori M, Ritelli M, Tagliabue S, Pacciarini ML. **Macrophage cell cultures for rapid isolation of intracellular bacteria: the *Mycobacterium bovis* model**. Methods Mol Biol. 2006; 345: 203–217

André FE. **Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises**. Vaccine 2003; 21: 593–595.

Argondizzo APC. **Construção do *M. bovis* BGC recombinante Sm14r e Avaliação da sua Capacidade Protetora contra Esquistossomose no Modelo Murino**. Rio de Janeiro; 2005. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] – FIOCRUZ

ATCC – *American type culture collection* **THP-1 Catalog Details: TIB-202** [online]. Manassas, EUA. 2006. [capturado em 10 de setembro de 2006]. Disponível em: <http://www.atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=TIB-202>

Atkinson S, Valadas E, Smith SM, Lukey PT, Dockrell HM. **Monocyte-derived macrophage cytokine responses induced by *M. bovis* BCG**. Tuber Lung Dis. 2000; 80 (4-5):197-207. Erratum in: Tuber Lung Dis 2000; 80 (6): 293.

Auwerx J. **The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation**. Experimentia. 1991; 47: 22–31.

Balls M. **Future Improvements: replacement *in vitro* methods**. ILAR J. 2002; 43 (Suppl): S69–S73

Bastos K.RB, Alvarez JM, Marinho CRF, Rizzo LV, D'Império Lima MR. **Macrophages from IL-12p40-deficient mice have a bias toward the M2 activation profile**. J. Leukoc. Biol. 2002; 71: 271–278

Bennett S, Por SB, Cooley MA, Breit SN. ***In vitro* replication dynamics of human culture-derived macrophages in a long term serum-free system**. J Immunol. 1993; 150 (6): 2364–2371

Berges C, Naujokat C, Tinapp S, Wieczorek H, Hoh A, Sadeghi M, Opelz G, Daniel V. **A cell line model for the differentiation of human dendritic cells.** Biochem Biophys Res Commun. 2005; 333 (3): 896–907

Beverley PCL. **Immunology of vaccination.** Br Med Bull. 2002; 62: 15-28

Bonah C. **The 'experimental stable' of the BCG vaccine: safety, efficacy, proof, and standards, 1921-1933.** Stud Hist Philos Biol Biomed Sci. 2005; 36(4): 696–721

Brito CF, Caldas IR, Coura Filho P, Correa-Oliveira R, Oliveira SC. **CD4+ T cells of schistosomiasis naturally resistant individuals living in an endemic area produce interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha in response to the recombinant 14KDA *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein.** Scand J Immunol. 2000; 51 (6): 595–601

Brusic V, August JT & Petrovsky N. **Information technologies for vaccine research.** Expert Rev Vaccines. 2005; 4 (3): 407–417

Campbell D, Mann BJ & Chadee K. **A subunit vaccine candidate region of the *Entamoeba histolytica* galactose-adherence lectin promotes interleukin-12 gene transcription and protein production in human macrophages.** Eur J Immunol. 2000; 30 (2): 423-30.

Capron A, Riveau G, Grzych JM, Boulanger D, Capron M, Pierce R. **Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomes: background and update.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 1995; 90 (2): 235–240

Carrel A. **On the permanent life of tissues outside the organism.** J. Exp. Med. 1912, 15: 516 – 528 *apud* Freshney RI. Introduction to basic principles. In: Masters JRW. **Animal cell culture: a practical approach.** 3rd ed. Oxford: Oxford University Press. 2000b: 1-18.

Chabalgoity JA, Baz A, Rial A, Grille S. **The relevance of cytokines for development of protective immunity and rational design of vaccines.** Cytokine Growth Factor Rev. 2007; 18 (1-2): 195–207

Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. **The global status of schistosomiasis and its control.** Acta Trop. 2000; 77 (1): 41–51

Ciabattini A, Cuppone AM, Pulimeno R, Iannelli F, Pozzi G, Medaglini D. **Stimulation of human monocytes with the gram-positive vaccine vector *Streptococcus gordonii*.** Clin Vaccine Immunol. 2006; 13 (9): 1037-43.

Clingan JM, Yanagawa Y, Iwabuchi K, Onoé K. **Effect of T helper 1 (Th1) / Th2 cytokine on chemokine-induced dendritic cell functions.** Cell Immunol. 2006; 242: 72–79.

Costa-Carvalho BT & Sole D. Bases Imunológicas. In: Farhat CK, Carvalho ES, Weckx LY, Carvalho LHFR, Succi RCM, org. **Imunizações: fundamentos e prática** 4^a ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2000. p. 19–36.

da Cruz FW, McBride AJA, Conceição FR, Dale JW, McFadden J, Dellagostin OA. **Expression of the B-cell and T-cell epitopes of the rabies virus nucleoprotein in *Mycobacterium bovis* BCG and induction of an humoral response in mice.** Vaccine. 2002; 20: 731–736

Dai W, Gao H, Huang H, Yuan Y, Hu J, Huangfu Y. **Comparative study on the immunogenicity between recombinant MS-Sj26GST vaccine and recombinant BCG-Sj26GST vaccine in *Schistosoma japonicum*.** J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2003, 23 (3): 213–5

Dellepiane N, Griffiths E & Milstien JB. **New challenges in assuring vaccine quality.** Bull World Health Organ. 2000; 78 (2): 155–62

Di Marzo P, Puddu P, Conti L, Belardelli F, Gesani S. **Interferon- γ up-regulates its own gene expression in mouse peritoneal macrophages.** J Exp Med. 1994; 179: 1731-1736.

Diaz-Silvestre H, Espinosa-Cueto P, Sanchez-Gonzalez A, Esparza-Ceron MA, Pereira-Suarez AL, Bernal-Fernandez G, Espitia C, Mancilla R. **The 19-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a major adhesin that binds the mannose receptor of THP-1 monocytic cells and promotes phagocytosis of mycobacteria.** Microb Pathog. 2005; 39 (3): 97–107

Doyle A & Griffiths JB. **Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology.** West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 1998. Cap.1 The cell: Selection and standardization. p. 3–52

Ellis RW. Technologies for making new vaccines. **In:** Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines.** 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2004. p. 1177–1198

Esser MT, Marchese RD, Kierstead LS, Tussey LG, Wang F, Chirmule N, Washabaugh MW. **Memory T cells and vaccines.** Vaccine. 2003, 21 (5-6): 419–430

Fantuzzi L, Puddu P, Varano B, Del Corno M, Belardelli F, Gessani S. **IFN-alpha and IL-18 exert opposite regulatory effects on the IL-12 receptor expression and IL-12-induced IFN-gamma production in mouse macrophages: novel pathways in the regulation of the inflammatory response of macrophages.** J Leukoc Biol. 2000; 68: 707-714.

FDA – *Food and drug administration.*. **Guidance for industry: Characterization and qualification of cell substrates and other biological starting materials used in the production of viral vaccines for the prevention and treatment of infectious disease.** [online]. Rockville: 2006. [capturado em 10 de janeiro de 2007]. Disponível em: <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>.

Fernandes ATG. **Identificação de células citotóxicas presentes no processo inflamatório uterino durante a co-infecção pelo vírus da imunodeficiência humana HIV e pelo vírus do papiloma humano HPV.** Rio de Janeiro. 2003. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] Fiocruz.

Freshney RI. Introduction to basic principles. In: Masters JRW, org. **Animal cell culture: a practical approach**. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press. 2000a. p. 1–18

_____. **Culture of animal cells: a manual of basic techniques**. 4th ed. New York: Wiley-Liss Inc. 2000b. Cap.1: Introduction. p. 1–8

Guermontprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. **Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells**. Annu Rev Immunol. 2002; 20: 621-67.

Haeseleer F. **Structural instability of recombinant plasmids in mycobacteria**. Res Microbiol. 1994; 145: 683–687

Harrison RG. **Observations on the living developing nerve fiber**. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1910, 140: 1905 – 7 *apud* Freshney RI. Introduction to basic principles. In: Masters JRW, org. **Animal cell culture: a practical approach**. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press. 2000b. p. 1-18.

Hasan Z, Ashraf M, Tayyebi A, Hussain R. **M. leprae inhibits apoptosis in THP-1 cells by downregulation of Bad and Bak and upregulation of Mcl-1 gene expression**. BMC Microbiol. 2006; 6: 1-9.

Hayward CMM, O'Gaora P, Young DB, Griffin GE, Thole J, Hirst TR, Castello-Branco LR, Lewis DJM. **Construction and murine immunogenicity of recombinant Bacille Calmette Guérin vaccines expressing the B subunit of Escherichia coli heat labile enterotoxin**. Vaccine. 1999, 17: 1272–1281.

Hendriksen CFM. **Laboratory animals and immunization procedures: challenges and opportunities**. ILIAR J. 2005; 46 (3): 227–229.

Henriques MGMO & Sampaio ALF. Alternativas para animais de laboratório: sistemas *in vitro*. In: Andrade A, Pinto SC & Oliveira RS, org. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002: 337–344

Kallás EG. **Detecção da produção antígeno-específica de IFN γ e IL-4 por linfócitos T de sangue periférico após infecção e vacinação**. São Paulo 1999. Doutorado [Escola Paulista de Medicina] Universidade Federal de São Paulo

Kaufmann SHE & Flynn JL. CD8 T cells in tuberculosis. In: Cole ST, Eisenach D, McMurray DN, Jacobs Jr WR, org. **Tuberculosis and the tubercle bacillus**. Washington: ASM Press. 2005. p. 155–164.

Kaufmann SH & Hess J. **Impact of intracellular location of and antigen display by intracellular bacteria: implications for vaccine development**. Immunol Lett. 1999; 65 (1-2): 81–4

Kidd P. **Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease**. Altern Med Rev. 2003; 8 (3): 223-246.

Kremer L, Dupre L, Riveau G, Capron A, Loch C. **Systemic and mucosal immune responses after intranasal administration of recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin expressing glutathione S-transferase from *Schistosoma haematobium*.** Infect Immun. 1998; 66 (12): 5669-5676.

Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, Graeber TG, Sieling PA, Liu YJ, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. **TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells.** Nat Med. 2005, 11 (6): 653–660

Laemmli UK. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature. 1970, 227: 680-685

Larsen NG. **Drug and Device Development Guide.** Copenhagen: Medicon Valley Academy. 2005. Cap. 1: Development – definition, costs and time. p. 9-13

Lebens M, Su J, Czerkinsky C, Holmgren J. **Current status and future prospects for a vaccine against schistosomiasis.** Expert Rev Vaccines. 2004; 3 (3): 315-328.

Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, Sherman DR. **Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation.** J Infect Dis. 2003; 187 (1): 117–123

MacCullough KC & Summerfield A. **Basic concepts of immune response and defense development.** ILAR J. 2005; 46 (3): 230–240.

Mantovani A, Sica A & Locati M. **Macrophage polarization comes of age.** Immunity. 2005; 23 (4): 344 – 346

MacFarland J. **Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines.** J Am Med Assoc. 1907; 14: 1176-1178

Medeiros MA. **Desenvolvimento do *Mycobacterium bovis* BCG como sistema de expressão de antígeno vacinal de *Bordetella pertussis*.** Pelotas; 2001. Doutorado – Universidade Federal de Pelotas.

Medeiros MA, Armoa GR, Dellagostin AO, McIntosh D. **Induction of humoral immunity in response to immunization with recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the S1 subunit of *Bordetella pertussis* toxin.** Can. J. Microbiol. 2005; 51 (12): 1015 - 20.

Metz B, Hendriksen CFM, Jiskoot W, Kersten GFA. **Reduction of animal use in vaccine quality control: opportunities and problems.** Vaccine. 2002, 20: 2411 – 2430

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Annette MH. **M1/M2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm.** J Immunol. 2000; 164: 6166-6173.

Misumi S, Endo M, Mukai R, Tachibana K, Umeda M, Honda T, Takamune N, Shoji S. **A novel cyclic peptide immunization strategy for preventing HIV-1/AIDS infection and progression.** J Biol Chem. 2003; 278 (34): 32335-43.

- Mosmann TR. **Cytokines: is there biological meaning?** Curr. Opin Immunol. 1991, 3: 311-314
- Mosmann TR & Coffman RL. **Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells.** Adv. Immunol. 1989, 46: 111-147
- Murray A, Winter N, Lagranderie M, Hill DF, Rauzier J, Timm J, Leclerc C, Moriaty KM, Gheorghiu M, Gicquel B. **Expression of *Escherichia coli* beta-galactosidase in *Mycobacterium bovis* BCG using an expression system isolated from *Mycobacterium paratuberculosis* which induced humoral and cellular immune responses.** Mol Microbiol. 1992, 6 (22): 3331-3342.
- NIAID - *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*. **Understand vaccines: What they are / How they work.** Washington: NIH publication, 2003. 55 pp.
- Ohara N & Yamada T. **Recombinant BCG vaccines.** Vaccine. 2001, 19: 4089–4098
- Oliveira MM, Charlab R, Pessolani MC. ***Mycobacterium bovis* BCG but not *Mycobacterium leprae* induces TNF-alpha secretion in human monocytic THP-1 cells.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96 (7): 973-978.
- Parlow TG. A resposta imunológica. In: Parlow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB, org. **Imunologia médica.** 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004. p. 52-60.
- Pearce EJ & McDonald AS. **The immunobiology of schistosomiasis.** Nat Rev Immunol. 2002; 2 (7):499-511.
- Plotkin SA. **Six revolutions in vaccinology.** Pediatr Infect Dis J. 2005a, 24 (1): 1–9
- _____. **Vaccines: past, present and future.** Nat Med. 2005b, 11 (4 Suppl): S5-S11.
- Plotkin SL & Plotkin SA. A short history of vaccination. In: Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines.** 4th ed. Philadelphia: Saunders, 2004: 1-12
- Presgrave OAF. **Teste de liberação de citocinas como método alternativo ao ensaio de pirogênio em coelhos no controle da qualidade de produtos injetáveis.** Rio de Janeiro; 2003. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] - Fundação Oswaldo Cruz
- Presgrave OAF. Alternativas para animais de laboratório: do animal ao computador. In: Andrade A, Pinto SC & Oliveira RS, org. **Animais de laboratório: criação e experimentação.** Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002. p. 361–368
- Rappuoli R. **From Pasteur to genomics: progress and challenges in infectious diseases.** Nat Med. 2004, 10 (11): 1177–1185
- Reis e Sousa C. **Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity.** Curr Opin Immunol. 2004a, 16 (1): 21–5

_____. **Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls.** *Semin Immunol.* 2004b, 16 (1): 27–34

Rezende CA, De Moraes MT, de Souza Matos DC, McIntoch D, Armoa GR. **Humoral response and genetic stability of recombinant BCG expressing hepatitis B surface antigens.** *J Virol Methods* 2005; 125 (1): 1–9.

Ribeiro de Jesus A, Araújo I, Bacellar O, Magalhães A, Pearce E, Harn D, Strand M, Carvalho EM. **Human immune responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens.** *Infect Immun.* 2000; 68 (5): 2797–803

Ritelli M, Amadori M, Tagliabue S, Pacciarini ML. **Use of a macrophage cell line for rapid detection of *Mycobacterium bovis* in diagnostic samples.** *Vet Microbiol.* 2003; 94: 105-120.

Rosenthal KS & Zimmerman DH. **Vaccines: All things considered.** *Clin Vaccine Immunol.* 2006; 13 (8): 821-829

Russell WMS. & Burch RL. **The Principles of Humane Experimental Technique.** London: Methuen. Smyth, D. 1959. 238 pp.

Saalmüller A. **New understanding of immunological mechanisms.** *Vet Microbiol.* 2006; 117 (1): 32-8.

Sander B. Skansén-Saphir, Damm O, Hakansson L, Andersson J, Andersson U. **Sequential production of Th1 and Th2 cytokines in response to live bacillus Calmette-Guerin.** *Immunology.* 1995, 86 (4): 512–8

Santiago ACC. **Correlação entre a colonização pelos isolados clínicos de *Mycobacterium avium* e a imunidade celular específica a antígenos micobacterianos em pacientes HIV-1 positivos.** Rio de Janeiro 2003. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] FIOCRUZ.

Santos JPS. **Avaliação da estabilidade estrutural e funcional de vetores plasmidiais recombinantes bifuncionais (*Escherichia coli* – *Mycobacterium*) em *Mycobacterium bovis* BCG.** Rio de Janeiro; 2002. Mestrado [Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes] – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Serruto D & Rappuoli R. **Post-genomic vaccine development.** *FEBS Lett.* 2006, 580: 2985–2992.

SLIPE – Sociedade Latinoamericana de Infectologia Pediátrica & API – Associação Panamericana de Infectologia. **Manual de Vacinas da América Latina.** Madrid: Euro RSCG Life Esquema, 2005. 620 pp.

Smith KC & Starke JR. Bacille Calmette-Guérin vaccine. **In:** Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines.** 4^a ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2004 p. 179–210

Smith SG, Patel PM, Selby PJ, Jackson AM. **The response of human dendritic cells to recombinant adenovirus, recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus**

Calmette Guerin and biolistic methods of antigen delivery: different induction of contact-dependant and soluble signals. Immunol Lett. 2001; 76 (2): 79-88.

Standiford TJ. **Anti-inflammatory cytokines and cytokine antagonists.** Curr Pharm Des. 2000, 6 (6): 633-49.

Stokes RW & Doxsee D. **The receptor-mediated uptake, survival, replication, and drug sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* within the Macrophage-like cell line THP-1: A comparison with human monocyte-derived macrophages.** Cell Immunol. 1999; 197: 1-9

Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, Bennett LT, Bansal GP, Young JF, Lee MH, Hatfull GF, Snapper SR, Barletta RG, Jacobs WR, Bloom RR. **New use of BCG for recombinant vaccines.** Nature. 1991, 351: 456-460.

Takahashi H. **Antigen presentation in vaccine development.** Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2003, 26 (5-6): 309–28

Tendler M, Brito CA, Vilar MM, Serra-Freire N, Diogo CM, Almeida MS, Delbem ACB, Silva JF, Savino W, Garrat RC, Katz N, Simpson AJG. **A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine.** Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93: 269–273

Theus SA, Cave MD & Eisenach KD. **Activated THP-1 cells: an attractive model for the assessment of intracellular growth rates of *Mycobacterium tuberculosis* isolates.** Infect Immun. 2004; 72(2): 1169-1173

_____. **Intracellular macrophage growth rates and cytokine profiles of *Mycobacterium tuberculosis* strains with different transmission dynamics.** Infect Dis. 2005; 191 (3): 453–60

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. **Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1).** Int. J. Cancer. 1980; 26: 171-176

Varaldo PB, Leite LCC, Dias WO, Miyaji EN, Torres FIG, Gebara VC, Armôa GRG, Campos AS, Matos DCS, Winter N, Gicquel B, Vilar MM, McFadden J, Almeida MS, Tendler M, McIntosh D. **Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* protects mice from cercarial challenge.** Infect Immun. 2004; 72(6): 3336-3343

Varaldo PB, Miyaji EN, Vilar MM, Campos AS, Dias WO, Armôa GRG, Tendler M, Leite LCC, McIntosh D. **Mycobacterial codon optimization of the gene encoding the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* in recombinant *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin enhances protein expression but not protection against cercarial challenge in mice.** FEMS Immunol Med Microbiol. 2006, 48 (1): 132-139.

Wack A & Rappuoli R. **Vaccinology at the beginning of the 21st century.** Curr Opin Immunol. 2005, 17 (4): 411– 418

WHO. *World health organization*. **TDR Progress: New and Improved Tools - New candidates in development: vaccine development schistosomiasis**. Geneva: 2000. [capturado em 16 de outubro de 2004]. Disponível em: <http://who.int/tdr/research/progress9900/tools/vaccine-schistossomiasis.htm>.

_____. **Global Plan to stop tuberculosis 2006-2015**. Geneva: WHO Press. 2006: 1-17

Wynn TA & Hoffmann KF. **Defining a schistosomiasis vaccination strategy – it is really Th1 versus Th2?** *Parasitol Today*. 2000; 16, (11): 497–501.

Xia HH, Lam SK, Chan AO, Lin MC, Kung HF, Ogura K, Berg DE, Wong BC. **Macrophage migration inhibitory factor stimulated by *Helicobacter pylori* increases proliferation of gastric epithelial cells**. *World J Gastroenterol*. 2005, 11 (13): 1946–1950

Xing Z, Zganiacz A & Santosuosso M. **Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF-alpha and nitric oxide from macrophages via IFN-gamma induction**. *J Leukoc Biol*. 2000; 68: 897-902.

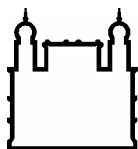
Zhao G, Etherton TD, Martin KR, Vanden Heuvel JP, Gillies PJ, West SG, Kris-Etherton PM. **Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells**. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 336 (3): 909–917.

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE AVALIAÇÃO DE
PROTÓTIPOS VACINAIS EM LINHAGEM DE MONÓCITO HUMANA
(THP-1)**

DANILO PARMERA

RIO DE JANEIRO
2007



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

DANILO PARMERA

**Desenvolvimento de um modelo de avaliação de protótipos
vacinais em linhagem de monócito humana (THP-1)**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos

RIO DE JANEIRO
2007

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas / ICICT / FIOCRUZ - RJ

P253 Parmera, Danilo

Desenvolvimento de um modelo de avaliação de protótipos vacinais em
linhagem de monócito humana (THP-1) / Danilo Parmera. – Rio de Janeiro,
2007.

xiii, 64 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos,
Tecnologia em Imunobiológicos, 2007.

Bibliografia: f. 56-64.

1. THP-1. 2. Vacina BCG. 3. Sm-14. 4. Vacina – Protótipo. 5. Citocinas.
I. Título.

CDD: 615.372

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico, Laboratório de Tecnologia Recombinate e no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Departamento de Micro-Imuno e Parasitologia, Serviço de Imunologia, Laboratório de Imunologia Celular, sob a orientação do Prof. Dr. Geraldo Rodrigues Garcia Armoa e Prof Dra. Maria da Glória Bonecini de Almeida.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

DANILO PARMERA

**Desenvolvimento de um modelo de avaliação de protótipos
vacinais em linhagem de monócito humana (THP-1)**

ORIENTADORES: Prof. Dr. Geraldo Rodrigues Garcia Armôa
Profª. Drª. Maria da Glória Bonecini de Almeida

Examinadores:

Prof. Dr. Douglas McIntosh – Bio-Manguinhos – Presidente

Profª. Drª. Cynthia Silveira Horn – IPEC/FIOCRUZ

Prof. Dr. Walter Martin Roland Oelemann – IMPPG/UFRJ

Rio de Janeiro

Dedico esta Dissertação a Deus,

pelo dom da vida.

a minha família

pelo carinho e apoio na minha trajetória,

à minha noiva, Fernanda,

pelo amor.

AGRADECIMENTOS

À FIOCRUZ, em nome de seu presidente Dr. Paulo Marchiori Buss, por proporcionar a excelência na produção de fármacos e imunobiológicos e no desenvolvimento científico de nosso país.

À Bio-Manguinhos, em nome do seu diretor Dr. Akira Homma, pela oportunidade e condições propiciadas à realização de uma pós-graduação profissional.

Ao IPEC, em nome da sua diretora Dra. Valdiléa Gonçalves Veloso, pelas condições propiciadas à realização da minha dissertação.

Ao orientador e amigo Prof. Dr. Geraldo Rodrigues Garcia Armôa por acreditar no meu potencial, pelos valorosos ensinamentos, apoio incondicional e incentivo aos trabalhos realizados.

À orientadora e amiga Prof^a. Dr^a. Maria da Glória Bonecini de Almeida pelas portas abertas de seu laboratório, possibilitando a execução deste trabalho e pela sincera atenção com que sempre me recebeu e pelo exemplo de pesquisadora.

Aos Professores, Coordenadora e Secretária do MPTI, que muito contribuíram na minha valorização humana e aos meios acadêmicos para ingresso, manutenção e término do curso.

À Dr^a. Cynthia Silveira Horn, pelas importantes contribuições durante a realização deste trabalho, em especial o experimento de proliferação celular.

Ao Dr. Douglas MacIntosh, pelas importantes contribuições durante a realização deste trabalho, em especial no auxílio na realização dos ensaios de *western blotting*, no cultivo das amostras de BCG e na revisão deste manuscrito.

Aos amigos Ana Paula Argondizzo, João Pedro Souza Santos, Gabriela dos Santos Esteves, Dilzamar Velloso do Nascimento, Dr. José Procópio Senna, Dr. Marco Antônio Medeiros, Natália Plínio dos Santos, Dra. Elezer Monte Blanco Lemes, Camilla Bayma, Dra. Ana Carolina Góes pelo companheirismo, amizade, solidariedade e apoio pessoal e profissional.

À amiga Maria Luiza Azevedo pela amizade, eficiência, disponibilidade de auxílio em todos os momentos e palavras reconfortantes nos momentos de desespero.

À doutoranda e amiga Ana Teresa Fernandes pela alegria e disposição no auxílio dos experimentos de imunocitoquímica

Aos tecnologistas e amigos Andréia Lamoglia e Márcio Mantuano pelo auxílio na realização dos experimentos realizados no citômetro de fluxo.

À amiga Larissa Catharina Costa pela colaboração e dedicação nos experimentos infinitos e pelos momentos divertidos no laboratório.

Ao amigo Dyego Carletti pelo auxílio no experimento de proliferação celular.

Aos colaboradores e amigos do Serviço de Imunologia, Dra. Liane Castro, Carla Bial, Márcia Andrade, Millena Rosalba, Ana Cristina Santiago Leandro, Marcelo Leandro, Leonardo Gatto, Silvia Silva, Regina Pimenta, Maristela Lima, Monique Lima e a equipe do laboratório de Imunodiagnóstico pelo companheirismo e apoio.

Aos companheiros do Mestrado Profissional, no qual dividimos boa parte de nossas manhãs, pela cooperação e companheirismo.

Aos parentes e amigos pelos momentos de descontração, conversas, apoio, amizade, alegrias e tristezas compartilhadas. (por serem muitos não serão citados, mas estarão sempre em minha memória)

A todas as pessoas que não foram nominalmente mencionadas, mas que contribuíram para viabilizar este trabalho.

E, finalmente, a Deus, que proporcionou a mim e a minha família os meios possíveis para alcançar a felicidade.

"ESPERE O MELHOR, PREPARE-SE PARA O PIOR E ACEITE O QUE VIER."

Provérbio Chinês

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	lx
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3. METODOLOGIA.....	15
3.1 Cultivo da célula THP-1.....	15
3.2. Cultivo das cepas de BCG.....	16
3.3 Avaliação da expressão da proteína recombinante Sm14 em BCG/ <i>sm14</i>	17
3.4 Padronização da multiplicidade de infecção (MOI) do BCG-P.....	18
3.5 Infecção com BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles em células THP-1.....	19
3.6 Avaliação da capacidade de proliferação celular da célula THP-1.....	19
3.7 Avaliação da estabilidade funcional (expressão do gene <i>kanR</i>) do vetor de expressão pAU5 dos BCGr.....	20
3.8 Protocolo de imunocitoquímica para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1.....	20
3.9 Protocolo de citometria de fluxo para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1.....	22
4. RESULTADOS.....	24
4.1 Cultivo da célula THP-1.....	24
4.1.1 Meios de cultivo.....	24
4.1.2 Manutenção.....	24
4.2. Cultivo das cepas de BCG.....	25
4.3 Expressão da proteína Sm14 pelo BCG/ <i>sm14</i>	26
4.4 Multiplicidade de infecção (MOI) BCG:THP-1	26

4.5 Capacidade de proliferação da célula THP-1 infectada pelo BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles.....	29
4.6 Avaliação da viabilidade e estabilidade funcional (expressão do gene <i>kanR</i>) do BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles recuperados de células THP-1	30
4.7. Avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles em células THP-1 por imunocitoquímica	31
4.8 Avaliação das citocinas a partir da infecção com BCG/ <i>sm14</i> e BCGs controles em células THP-1 por Citometria de Fluxo	34
4.9 Comparação entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo.....	39
4.9.1 Detecção de IL-10.....	39
4.9.2 Detecção de IL-12.....	41
4.9.3 Detecção de TNF- α	43
5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÕES	54
7. PERSPECTIVAS	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	grau Celsius
μCi	micro Curie
μL	Microlitro
μg	Micrograma
ADC	Albumina – Dextrose – Catalase
APC	<i>Antigen presenting cells</i> – célula apresentadora de antígenos
API	Associação Panamericana de Infectologia
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATLA	<i>Alternatives to Laboratory Animals</i>
BCG	<i>Mycobacterium bovis</i> Bacilo Calmette-Guérin
BCG-P	<i>M. bovis</i> Bacilo Calmette-Guérin sub-cepa Pasteur 1173P2
BCGr	<i>M. bovis</i> Bacilo Calmette-Guérin recombinante
BCG/pAU5	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepa Pasteur transformado o vetor de expressão pAU5
BCGr/pPL73-sm14	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepa Pasteur 1173P2 transformado com vetor de expressão pPL73 contendo o gene <i>sm14</i> de <i>S. mansoni</i>
BCG/sm14	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepa Pasteur 1173P2 transformado com o vetor de expressão pAU5 contendo o gene <i>sm14</i> de <i>S. mansoni</i>
Bio-Manguinhos	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
BP	<i>Band pass</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i> – grupo de diferenciação 4
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i> – grupo de diferenciação 8
cm ²	Centímetro quadrado
CMI	<i>Cell-mediated immunity</i> – Imunidade mediada por células
Com	Contagem por minuto
CO ₂	Gás carbônico
CpG	Dinucleotídeo formado pela ligação fosfodiéster de citosina com guanina na mesma fita de DNA
CTFA	<i>Cosmetic, Toiletries and Frangrance Association</i>

DAB	3-3' diaminobenzidina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> – Meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> – Ácido desoxirribonucleico
Dr(a).	Doutor(a)
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECVAM	<i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i>
EUA	Estados Unidos da América
FABP	<i>Fatty acid binding protein</i> - Proteína ligante a ácidos graxos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> – Isotiocianato de fluoresceína
FL	Análise de fluorescência (citometria de fluxo)
FRAME	<i>Fund for Replacement of Animal Medical Experiments</i>
FSC	<i>Foward angle light scatter</i>
g	Gramas
<i>g</i>	Aceleração gravitacional
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i> – Solução salina de Hank
HEPES	Acido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IFN	Interferon
IMPPG	Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
IRAG	<i>Interagency Regulatory Alternatives Group</i>
Kan	Canamicina
<i>KanR</i>	Gene de resistência à canamicina derivado do Tn903
kDa	Kilodaltons
LATER	Laboratório de Tecnologia Recombinante
log	Logaritmo
log ₁₀	Logaritmo na base 10
LPS	Lipopolissacarídeo

LSAB	<i>Labeled StreptAvidin Biotin</i>
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
M1	Macrófago tipo 1
M2	Macrófago tipo 2
MDM	<i>Monocyte-derived macrophage</i> – Macrófago derivado de monócito
MEM	<i>Minimum essential medium of Eagle</i> – Meio mínimo essencial de Eagle
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> - Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitro
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> – Multiplicidade de infecção
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Msc	Mestre
nº	Número
ng	Nanograma
NIAID	<i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i> - EUA
NK	<i>Natural killer cells</i> – Células matadoras naturais
nm	Nanômetro
O ₂	Gás oxigênio
OADC	Ácido oléico – Albumina – Dextrose – Catalase
<i>oriE</i>	Origem de replicação do bacteriófago T4 de <i>Escherichia coli</i>
<i>oriM</i>	Origem de replicação do plasmídeo pAL5000 de <i>Mycobacterium fortuitum</i>
PA	<i>pro analisis</i> - para análise
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> – Padrões moleculares associados ao patógeno
PAPES	Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde
pAU5	Vetor de expressão citoplasmático
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> - Células mononucleares do sangue periférico
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> - Salina tamponada de fosfato

PBS-T	<i>Phosphate-buffered saline Tween20</i> - Salina tamponada de fosfato com Tween20
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
PE	<i>Phycoerythrin</i> - Ficoeritrina
pH	Potencial hidrogenionico
<i>Phsp60*</i>	Promotor <i>hsp60</i> de <i>Mycobacterium bovis</i> BCG modificado
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
POPOP	p-bis[2(5-. feniloxazoil)]-benzeno
PPO	2,5-difeniloxazol
Prof(a)	Professor (a)
PRR	<i>Pattern-recognition receptors</i> – Receptores de reconhecimento padrão
R1	Região de análise (citometria de fluxo)
Reg	Registro
rpm	Rotação por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> – Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SFB	Soro fetal bovino
SLIPE	Sociedade Latinoamericana de Infectologia Pediátrica
Sm14	Proteína de <i>Schistosoma mansoni</i>
Sm14r	Proteína recombinante de <i>S. mansoni</i> expressa em <i>E. coli</i>
<i>sm14</i>	Gene de <i>S. mansoni</i>
SSC	<i>Side angle light scatter</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> – Salina tamponada de Tris
TBS-T	<i>Tris-buffered saline Tween 20</i> – Salina tamponada de Tris com Tween 20
Tc	<i>T cytotoxic cell</i> – Célula T citotóxica
TCR	<i>T cell receptor</i> – receptor de célula T
TDR	<i>Special programme for research and training in tropical disease</i>

TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i> - Fator transformador de crescimento beta
Th	<i>T helper cell</i>
Th1	<i>T helper cell type 1</i> – Célula T auxiliar tipo 1
Th2	<i>T helper cell type 2</i> – Célula T auxiliar tipo 2
Timidina-H ³	Timidina tritiada
TLR	<i>Toll like receptor</i> – Receptor do tipo Toll
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alfa</i> - Fator de necrose tumoral alfa
TPA	12-O-tetradecanolforbol-13-acetato
Treg	<i>T regulatory cell</i> – Célula T regulatória
UFC	Unidades formadoras de colônias por mililitro
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
v	Volume
WHO	<i>World Health Organization</i> – Organização Mundial da Saúde
x	Vezes

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Características das cepas de BCGs	16
Tabela 3.2: Anticorpos utilizados no protocolo de imunocitoquímica.....	21
Tabela 3.3: Anticorpos utilizados no protocolo de citometria de fluxo.....	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Visão esquemática da indução do sistema imune gerada por um patógeno ou uma vacina.....	08
Figura 1.2: Diagrama do modelo molecular da proteína Sm14.....	11
Figura 4.1: Microscopia óptica (200 x) de células THP-1, após três passagens, mantidas em meio RPMI 1640 preparado com 0,2% de NaHCO ₃ e suplementado com 10% de SFB.....	24
Figura 4.2: Cultura de <i>M. bovis</i> BCG Pasteur cultivado em meio 7H11 suplementado com 10% de OADC.....	25
Figura 4.3: Expressão da proteína Sm14 produzida pelos quatro clones de BCG/ <i>sm14</i> utilizados nos experimentos de infecção.....	26
Figura 4.4: Expressão de IL-10, IL-12 e TNF- α em células THP-1 infectadas com BCG-P.....	28
Figura 4.5: Atividade proliferativa das células THP-1 infectadas pelo BCG/ <i>sm14</i> e pelos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5)	29
Figura 4.6: Cinética da viabilidade do protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e dos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5) recuperados de células THP-1 e cultivados nos meios Middlebrook 7H11 7H11/Kan.....	31
Figura 4.7: Microscopia óptica (1000 x) de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após 24 horas de infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), detectadas por imunocitoquímica.....	32
Figura 4.8: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica.....	33
Figura 4.9: Determinação da região de análise das células THP-1 mantidas em cultivo celular.....	34

Figura 4.10: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 TNF- α e após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	35
Figura 4.11: Gráfico tamanho (FSC) <i>versus</i> fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	36
Figura 4.12: Gráfico tamanho (FSC) <i>versus</i> fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	37
Figura 4.13: Gráfico tamanho (FSC) <i>versus</i> fluorescência (FL1 ou FL2) da avaliação de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria.....	38
Figura 4.14: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria de fluxo.....	40
Figura 4.15: Percentagem de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria.....	42
Figura 4.16: Percentagem de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/ <i>sm14</i> e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria.....	44
Figura 5.1: Modelo esquemático das etapas necessárias para implantação de novos fármacos e imunobiológicos.....	47

RESUMO

As culturas de células vêm sendo utilizadas extensivamente no desenvolvimento e na produção de uma variedade de produtos terapêuticos e profiláticos, tornando-se uma ferramenta indispensável para geneticistas, imunologistas, vacinologistas e a indústria farmacêutica. A adoção de sistemas de ensaios celulares *in vitro* tem sido aplicada como um método alternativo para a substituição ou diminuição do uso de animais nas fases de desenvolvimento, produção e testes de vacinas, demonstrando resultados promissores. Da mesma forma, sistemas computacionais podem ampliar a utilização desta ferramenta para etapas do desenvolvimento de vacinas candidatas na fase pré-clínica. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um protocolo *in vitro* utilizando culturas de células humanas - a linhagem de monócitos THP-1, para a seleção de um protótipo vacinal - a cepa Pasteur de *Mycobacterium bovis* BCG expressando o antígeno Sm14 de *Schistosoma mansoni* (BCG/sm14). Para isso foram empregadas duas metodologias – citometria de fluxo e imunocitoquímica, para a identificação do perfil da expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α . Foram utilizados como controles a cepa Pasteur do *M. bovis* BCG e a construção da cepa Pasteur do *M. bovis* BCG contendo o vetor de expressão pAU5 (BCG/pAU5). Após padronização, a multiplicidade de infecção utilizada para os experimentos foi de 10 bacilos para 1 célula THP-1 (10MOI). A expressão da proteína Sm14 foi detectada em todos os protótipos vacinais. Para assegurar que o protótipo BCG/sm14 era capaz de diferenciar a linhagem de monócitos THP-1 em macrófagos, avaliamos a taxa de crescimento celular e foi possível observar que após a infecção estas células apresentavam o índice de proliferação diminuído em 2 logs em relação à célula não infectada. O protótipo vacinal BCG/sm14 não mostrou diferenças quanto a capacidade de infecção, a taxa de persistência intracelular e a estabilidade da construção plasmidial. As duas metodologias empregadas mostraram resultados discrepantes em relação ao percentual de citocinas expressas após a infecção com o protótipo vacinal ou os BCG controles, mostrando um maior percentual de células positivas quando avaliados por citometria de fluxo. Contudo, mesmo com esta diferença observamos que o protótipo vacinal BCG/sm14 não alterou o perfil de expressão de IL-10, IL-12 e TNF- α . O fato do plasmídeo pAU5 ser um vetor de expressão citoplasmática, sugere que a proteína Sm14 não foi capaz de estimular a mudança de citocinas em monócitos humanos. Experimentos futuros devem investigar o papel do BCG/sm14 em macrófagos maduros, quanto a indução de citocinas pró e anti-inflamatórias, TLR, bem como na indução da resposta imune adaptativa, como a apresentação antigênica, na tentativa de melhor entender a resposta imune a esta vacina candidata.

ABSTRACT

Cell cultures has been used extensively in the development of a broad range of therapeutic and prophylactic products, and are an important tool for geneticists, immunologists, vaccinologists and the pharmaceuticals industry. *In vitro* cell assay has been applied as an alternative method to replace or diminish the use of animal model in the developmental, production in vaccine test phases, with promising results. Otherwise, computational methods should amplify the use of cell cultures tools to test candidate vaccines. The main goal of this work was to develop an *in vitro* protocol using human cell line – monocytic cell THP-1, to select a vaccine prototype – strain Pasteur *Mycobacterium bovis* BCG expressing *Schistosoma mansoni* Sm14-antigen (BCG/sm14). Two methodologies were employed – a flow cytometry and immunocytochemistry, to quantify the expression of IL-10, IL-12 e TNF- α . Pasteur *M. bovis* BCG and the strain Pasteur do *M. bovis* BCG containing the expression vector pAU5 (BCG/pAU5) were used as controls. Multiplicity of infection (MOI) was determined and showed a better 10 bacilli to 1 cells ratios, regarding the expression of intracellular cytokines. Sm14 protein expression was detected in all vaccine prototype before use. To assure that BCG/sm14 was able to differentiate monocytic THP1 cell line in mature macrophage, we evaluated the proliferative ration after BCGs infection and all strain showed the ability to induce monocytic THP1 cells maturation, diminishing in 2.0 logs the cell proliferation. No differences were seen in the uptake, intracellular persistence and plasmidial stability. Interestingly, we observe discrepant results regarding the amount of positive cells expressing cytokines detected by the two methods used, independent of which BCG was tested. The overall results obtained by the cytometric method was high than immunocytochemistry. However, beside these ambiguous results, no alteration in the IL-10, IL-12 and TNF-alfa profile was observed when BCG/sm14 was compared with BCG. These results point to the plamidial BCG construction pAU5 and its intracellular expression, suggesting no modification in the cytokine profile in human monocytic cell lines. Further experiments should be addressed to identify the role of BCG/sm14 in modulate mature macrophage and, the induction of adaptive immune response, as antigen presentation, pro- and anti-inflammatory cytokines, TLR expression and activation, to better understating the vaccine prototype immune response .

1. INTRODUÇÃO

A vacinologia é uma ciência combinatória que estuda a diversidade de agentes patogênicos, o sistema imune humano e preparações vacinais que possam modular a resposta imune para prevenir ou curar as doenças causadas por esses patógenos (Brusic, August & Petrovsky 2005). Sendo a vacina um imunógeno não-patogênico que ao ser inoculado em um indivíduo é capaz de induzir imunidade protetora contra um patógeno específico (Parslow 2004), a vacinação, bem como a limitação à exposição de pessoas saudáveis às infectadas e eliminação da fonte ou meios de disseminação do agente infeccioso, contribui para a prevenção de doenças. As propriedades necessárias para uma vacina ideal são: promover imunidade ao longo da vida, ser largamente protetora contra todas as variantes do patógeno, prevenir a transmissão de doença, induzir a imunidade rapidamente, ser eficaz em todas as pessoas vacinadas, transmitir a proteção materna ao feto, possuir baixo custo, ser estável, ser segura e necessitar de poucas ou, de maneira ideal, uma só administração que induza proteção. (Ada 2001, Beverley 2002, NIAID 2003).

O desenvolvimento das vacinas ao longo da história pode ser destacado de acordo com as revoluções tecnológicas aplicadas na vacinologia (Plotkin 2005a). No final do século XVIII o médico inglês Edward Jenner realizou a experiência que foi considerada o marco da imunologia como ciência. Jenner inoculou, a partir de arranhões feitos no braço de um menino de oito anos (James Phipps), o líquido extraído da vesícula causada pela varíola bovina da mão da ordenhadeira Sarah Nelmer (André 2003, Plotkin & Plotkin 2004). Contudo, somente quase um século após a descoberta de Jenner, Louis Pasteur desenvolveu o conceito que levaria à primeira revolução da vacinologia: a atenuação da virulência de patógenos, criando a primeira vacina em laboratório e instituindo o conceito de vacinação. Pasteur estabeleceu as bases do que ficou conhecida como abordagem clássica para o desenvolvimento de vacinas, que incluem o isolamento do patógeno, a perda da virulência (atenuação) e a imunização com partes do microrganismo ou o microrganismo inteiro (Plotkin & Plotkin 2004, Plotkin 2005b, Serruto & Rappuoli 2006).

No final do século XVIII, Salmon e Smith descreveram o conceito que levaria a segunda revolução tecnológica da vacinologia, a inativação do patógeno para o desenvolvimento de preparações vacinais. A expansão deste conceito levou a

construção de vacinas feitas a partir de toxinas detoxificadas (toxóides) e frações subcelulares como polissacarídeos, proteínas e conjugados (Plotkin & Plotkin 2004, Plotkin 2005a, Plotkin 2005b). A adaptação de cultura de células para o cultivo de vírus visando a obtenção de preparações vacinais foi considerada a terceira grande revolução tecnológica utilizada pela vacinologia (Plotkin & Plotkin 2004, Plotkin 2005a, Plotkin 2005b). A introdução de novas estratégias para o desenvolvimento de vacinas a partir da utilização de técnicas de biologia molecular como: clonagem de genes e expressão de proteínas recombinantes, criação de partículas defectivas, desenvolvimento de vetores vivos atenuados, sequenciamento de genomas, genômica comparativa, proteômica e vacinologia reversa; abriram novas fronteiras na vacinologia para a busca de preparações imunogênicas que sejam efetivas no combate às doenças infecciosas. Essa nova onda de desenvolvimento está sendo considerada como a quarta revolução tecnológica da vacinologia (Ellis 2004, Plotkin 2005a, Plotkin 2005b, Serruto & Rappuoli 2006).

A compreensão e a importância da resposta imune após a vacinação sofreram um avanço notável nos últimos anos (Saalmüller 2006), marcando assim uma nova era para o desenvolvimento de vacinas. Para Plotkin (2005b), o novo foco dos vacinologistas está no desenvolvimento de meios, como vetores, replicons, lipopeptídeos e adjuvantes que dirijam a polarização do sistema imune para uma resposta do tipo 1, ou seja, a estimulação da imunidade celular. Plotkin destaca também o desenvolvimento de novas rotas de imunização tais como intranasal, aerossol, transcutânea, oral e retal (Plotkin 2005b). Já para Rappuoli (2004), a vacinologia atual está focada no processo de obtenção de imunógenos a partir da investigação pan-genômica, análise por microarranjos de DNA (*DNA microarray*) e proteômica, numa abordagem conhecida como vacinologia reversa. Serruto e Rappuoli (2006) enfatizam que o futuro do desenvolvimento de vacinas está na chamada vacinologia estrutural, na qual através da resolução atômica e da estrutura dos antígenos potenciais, será realizado o desenho racional dos epítomos alvos usados como candidatos vacinais. Observa-se então que a integração entre a tecnologia básica, os avanços tecnológicos na biologia molecular e o aumento do entendimento da resposta imune são a base para o desenvolvimento de novos candidatos a preparações vacinais (Rosenthal & Zimmerman 2006).

A imunidade, ou resposta imune, pode ser dividida em dois tipos: a imunidade inata e a imunidade adquirida ou adaptativa. A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa contra agentes patogênicos e consiste no desencadeamento de

mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que já existiam antes do estabelecimento de uma infecção e que atuam da mesma forma em infecções sucessivas. As barreiras anatômicas (pele e epitélio de mucosa), barreiras fisiológicas (temperatura, áreas com baixo pH, mediadores químicos), fagócitos mono e polimorfonucleares e barreiras inflamatórias são parte da imunidade inata (Parslow 2004, Abbas & Lichtman 2005b, McCullough & Summerfield 2005). As células da imunidade inata utilizam receptores de reconhecimento padrão (*pattern-recognition receptors* – PRR) do tipo Toll (*Toll like receptors* - TLRs) para o reconhecimento de estruturas microbianas altamente conservadas que não estão presentes em células de mamíferos, como padrões moleculares associados ao patógeno (*pathogen-associated molecular patterns* – PAMPs). Os TLRs possuem a capacidade de reconhecer diferentes PAMPs, como seqüências CpG de DNA não metiladas, lipídeos e carboidratos complexos como lipopolissacarídeos (LPS) e ácidos teicóicos (Reis e Sousa 2004b, Krutzik *et al.* 2005, Rosenthal & Zimmerman 2006).

A imunidade adaptativa caracteriza-se por sua alta especificidade e por ampliar a magnitude da resposta após sucessivas exposições a um determinante antigênico. Além dos muitos mecanismos da imunidade natural necessários à eliminação dos microorganismos invasores, a imunidade adaptativa utiliza a seleção e a mutação somática na geração de seu repertório imune desenvolvendo duas outras propriedades adicionais: a memória em relação aos contatos anteriores com um determinado antígeno, de modo que as exposições subseqüentes estimulem respostas de defesa gradativamente mais efetivas, e a capacidade de amplificar os mecanismos protetores da imunidade natural, direcionando-os para os locais de entrada do antígeno e melhorando o processo de eliminação dos elementos estranhos ao organismo hospedeiro (Costa-Carvalho & Solé 2000). A imunidade adaptativa é classificada como humoral ou celular em função do componente do sistema imunológico intermediador da resposta imune. A imunidade humoral é mediada por anticorpos, que são capazes de efetuar o reconhecimento específico agindo na neutralização de microorganismos e toxinas, na ativação do sistema do complemento e na opsonização de antígenos para aumento da fagocitose. A imunidade celular ou mediada por células (*cell-mediated immunity* – CMI) refere-se à resposta imune efetora das células T atuando na ativação de fagócitos, estimulação das atividades microbicidas dos macrófagos, células T e células *natural killer* (NK) na destruição de células infectadas. A CMI atua na defesa contra microorganismos

intracelulares, na imunidade antitumoral e na rejeição de aloenxertos (Parslow 2004, McCullough & Summerfield 2005).

As células T podem ser classificadas em dois grandes grupos de acordo com a expressão dos antígenos de superfície: T CD4 e T CD8. As células T CD8 efetoras são funcionalmente conhecidas como células T citotóxicas (T *cytotoxic* – Tc). As células Tc atuam principalmente na lise de células infectadas com patógenos presentes em seu citoplasma, desempenhando sua função através da liberação de dois tipos de citotoxinas: as granzimas, que são capazes de induzir apoptose na célula-alvo e as perforinas, que perfuram a membrana celular da célula-alvo facilitando a ação das granzimas (Esser *et al.* 2003, Kaufmann & Flynn 2005). Já as células T CD4 efetoras são funcionalmente conhecidas como células T auxiliares (T *helper* – Th). As células Th desempenham um papel central na função de vários processos como ativação, inibição, regulação, diferenciação e proliferação de diferentes tipos celulares como as células T CD8, células B, células NK, eosinófilos e macrófagos, tanto por contato célula-célula como pela produção de citocinas (Esser *et al.* 2003, Kidd 2003). As células Th são divididas principalmente em duas sub-populações fenotipicamente distintas, T *helper* tipo 1 (Th1) ou T *helper* tipo 2 (Th2), que proporcionam a estruturação de um modelo útil na compreensão da imunorregulação dependente de célula T (Mosmann & Coffman 1989, Mosmann 1991, McCullough & Summerfield 2005).

O conceito de células Th1/Th2 baseia-se na dicotomia do perfil de citocinas expressas, uma vez que cada sub-população de célula Th amplifica a si mesma e promove a regulação cruzada da sub-população recíproca. As citocinas produzidas por células Th1 são reconhecidamente capazes de suprimir a proliferação celular, a síntese de citocinas e/ou a atividade biológica induzidas por citocinas da resposta Th2, e vice-versa. Nas respostas imunes geradas pelas células Th1 as principais citocinas produzidas são as interleucinas (IL) 2 e o interferon gama (IFN- γ) direcionando o sistema imune para uma resposta mediada por células. A produção de anticorpos não é uma característica proeminente da resposta Th1, mas sua combinação com a resposta celular é necessária no combate de infecções intracelulares e fúngicas e de células cancerosas através de mecanismos diretos (destruição de células infectadas) e indiretos como a ação do interferon na proteção de células não infectadas (Esser *et al.* 2003, Kidd 2003, Rosenthal & Zimmerman 2006). Já as respostas imunes geradas pelas células Th2 são especialmente eficazes contra parasitas extracelulares e toxinas por mecanismos dependentes de

anticorpo e as citocinas dominantes produzidas são IL-4, IL-5, IL-10, e IL-13, direcionando para uma alta produção de anticorpos (Esser *et al.* 2003, Kidd 2003, Clingan *et al.* 2006, Rosenthal & Zimmerman 2006).

As células T não possuem receptores capazes de reconhecer diretamente antígenos. Os receptores de antígenos das células T (*T cell receptors* – TCRs) reconhecem somente fragmentos de antígenos expostos na superfície de outras células associados principalmente a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (*Major histocompatibility complex* - MHC). Há dois tipos principais de moléculas de MHC, denominadas de moléculas de MHC de classe I e moléculas de MHC de classe II e seu padrão de expressão está intimamente ligado às funções das células T. As moléculas MHC de classe I são expressas por todas as células do organismo exceto hemácias, sendo complexadas a antígenos encontrados no citoplasma celular e reconhecidas pelas células Tc. As moléculas MHC de classe II são expressas principalmente por células especializadas conhecidas como células apresentadoras de antígenos (*antigen presenting cells* – APC), que apresentam antígenos oriundos de vesículas endocíticas as células Th (Esser *et al.* 2003).

As APCs são células especializadas na captura de microorganismos e outros antígenos, na apresentação desses antígenos às células T e na expressão de sinais que estimulam a proliferação e diferenciação de linfócitos (Takahashi 2003, Abbas & Lichtman 2005b), possuindo um papel crucial na interação entre as imunidades inata e adaptativa. Seus principais representantes são as células dendríticas, os linfócitos B e os macrófagos (Guermonprez *et al.* 2002, Abbas & Lichtman 2005b). As células dendríticas são conhecidas como APCs profissionais por possuírem como função a captura e a apresentação de antígenos às células T virgens, promovendo juntamente com sinais co-estimulatórios, a expansão clonal e a diferenciação em células T efetoras (Guermonprez *et al.* 2002, Takahashi 2003, Reis e Sousa 2004a). As células B, dentre outras funções, são capazes de apresentar antígenos às células T efetoras sendo essenciais para a produção de anticorpos dependentes de células Th (Parlow 2004).

Os macrófagos são células fagocitárias mononucleadas, derivados dos monócitos sanguíneos e são encontrados nos tecidos desempenhando importantes papéis nas respostas imunes inata e adquirida. Possuem um papel central na resposta inicial à infecção antes da ação da imunidade mediada pelas células T e B, sendo importantes na fase de indução de inflamação, reorganização e reparo dos

tecidos, além de realizarem funções efetoras. São classificados como células apresentadoras de antígenos e têm diversas atividades, como atividade antimicrobiana e antitumoral, modulação de várias células, e promoção de quimiotaxia (Auwerx 1991, Mills *et al.* 2000, Berges *et al.* 2005).

Os macrófagos foram denominados M1 e M2 de acordo com o seu padrão de ativação (Mills *et al.* 2000). Assim, macrófagos M1 provenientes de células Th1 apresentam uma resposta efetora caracterizada pela produção dominante de óxido nítrico (NO) em resposta ao LPS ou IFN- γ exógeno. Macrófagos M2, de linhagens Th2, por sua vez, exibem um perfil tolerante caracterizado pela produção de altos níveis de fator transformador de crescimento beta (*transforming growth factor beta* - TGF- β) (Bastos *et al.* 2002, Mantovani, Sica & Locati 2005). O padrão de ativação assumido por esses macrófagos parece ser independente de linfócitos, uma vez que macrófagos de camundongos apresentam a mesma polarização. Esse fato sugere a importância das citocinas produzidas por essas células na regulação de suas funções. A influência da IL-10, IL-12, IL-18, IFN- α e IFN- γ na regulação autócrina de macrófagos tem sido descrita, demonstrando que os macrófagos não apenas obedecem às ordens dos linfócitos T, como podem até mesmo comandar o tipo de resposta dessas células. Adicionalmente, através das citocinas produzidas por eles, são aptos a se auto-regularem (Di Marzo *et al.* 1994, Fantuzzi *et al.* 2000, Mills *et al.* 2000, Xing, Zganiacz & Santosuosso 2000, Bastos *et al.* 2002, Mantovani, Sica & Locati 2005).

As citocinas constituem um grupo de proteínas de baixo peso molecular, geralmente glicosiladas, secretadas por diferentes células do sistema imune, como linfócitos, monócitos e macrófagos. Suas ações são geralmente pleiotrópicas, podendo atuar de forma autócrina, parácrina e endócrina, na mediação de diferentes efeitos biológicos (Abbas & Lichtman 2005a). Dentre as citocinas utilizadas para a avaliação de protótipos vacinais na ativação de APCs, podemos destacar TNF- α , IL-10 e IL-12 (Henriques & Sampaio 2002, Abbas & Lichtman 2005a). A IL-10 é uma citocina reguladora secretada por macrófagos ativados e por algumas células Th. Tem ação anti-inflamatória, agindo na inibição de macrófagos e células dendríticas ativadas, inibindo a ação de IL-12, TNF- α e IFN- γ , com efeitos associados ao término das reações da CMI (Standiford 2000, Atkinson *et al.* 2000, Abbas & Lichtman 2005a). A IL-12 é a principal citocina mediadora da resposta imune inata a patógenos intracelulares, dentre os quais as micobactérias, sendo um importante indutor de CMI. Atua na ativação de células T citotóxicas e células NK induzindo a

produção de INF- γ , o qual ativa os macrófagos infectados e na diferenciação das células Th1, possuindo um importante papel na interação entre a imunidade inata e adaptativa (Atkinson *et al.* 2000, Abbas & Lichtman 2005a). O TNF- α é uma das principais citocinas mediadoras da resposta pró-inflamatória produzida principalmente por fagócitos mononucleares ativados além de células T, células NK e mastócitos. Atua principalmente no recrutamento de neutrófilos e monócitos para os sítios de infecção, na indução de macrófagos e células endoteliais para secreção de quimiocinas e na indução de apoptose em algumas células (Atkinson *et al.* 2000, Standiford 2000, Abbas & Lichtman 2005a).

Os monócitos e macrófagos possuem um papel crucial na apresentação de antígenos estranhos a outras células do sistema imune e na produção de sinais que direcionam o padrão da resposta imune necessária para cada tipo de patógeno. Dentre os sinais podemos destacar as citocinas, que são proteínas imunomoduladoras que ajudam a direcionar a resposta imune em diversos processos inflamatórios incluindo processos infecciosos (Xing, Zganiacz & Santosuosso 2000, Berges *et al.* 2005). Por essas características, os macrófagos vêm sendo utilizados para avaliar o perfil imunogênico de diferentes antígenos candidatos à vacina (Campbell, Mann & Chadee 2000, Misumi *et al.* 2003, Ciabattini *et al.* 2006). Adicionalmente, é importante considerar que entre os principais requerimentos para o sucesso da vacinação está a ativação das APCs, que envolve o processamento de antígenos, a expressão de fatores co-estimulatórios, e a secreção de citocinas, que é essencial para o início da resposta imune (Ada 2004).

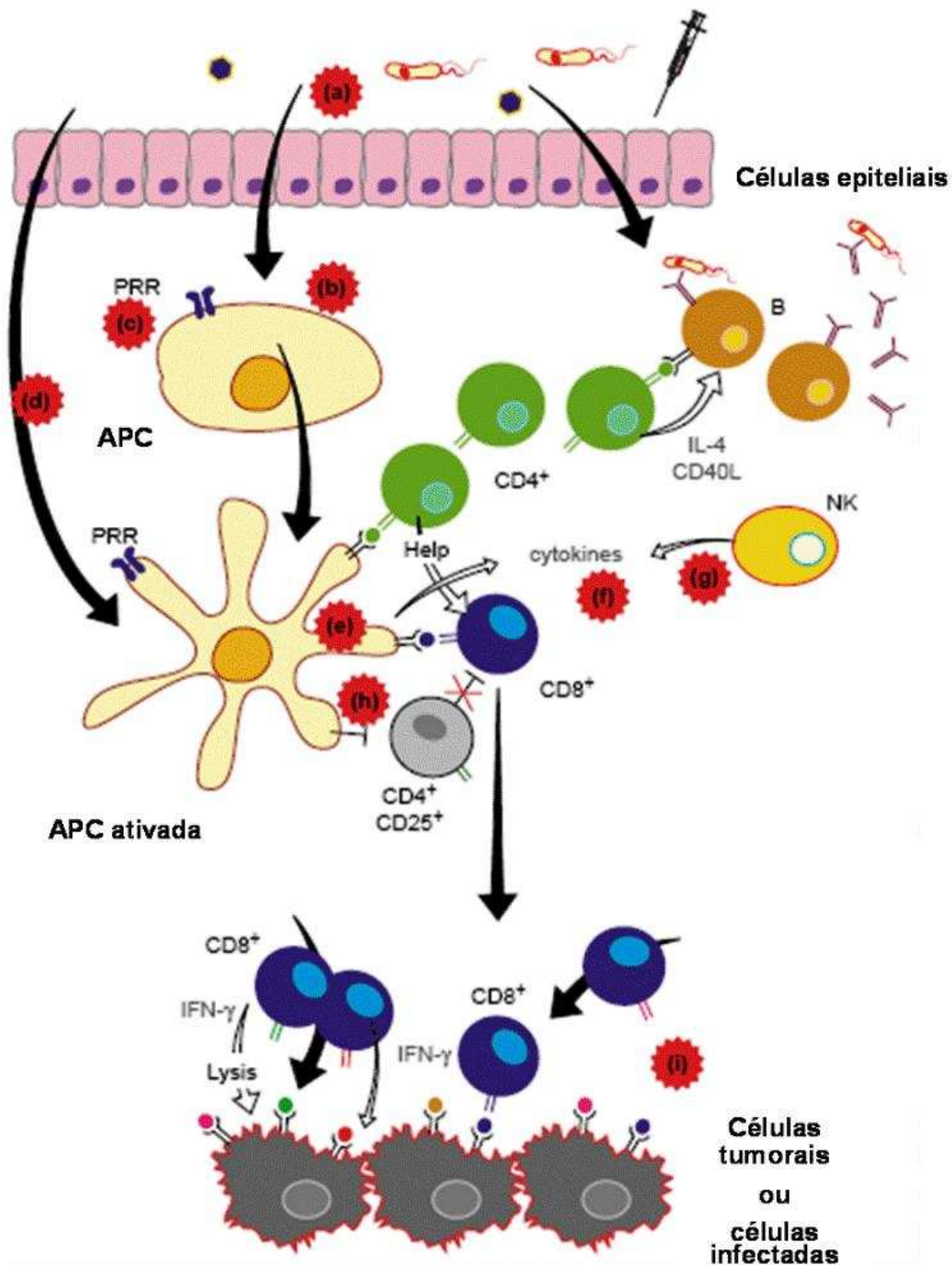


Figura 1.1: Visão esquemática da indução do sistema imune gerada por um patógeno ou uma vacina (Adaptado de Wack & Rappuoli 2005). As letras de (a) a (i) indicam situações onde o melhoramento de vacinas pode levar a respostas imunes mais eficientes. (a) A via de inoculação pode influir no tipo de resposta imune e reduzir o número de doses. (b) O antígeno particulado é reconhecido mais facilmente por APCs em relação ao antígeno solúvel. (c) Aumento da ativação de APCs através do reconhecimento de imunoestimulantes pelas PRRs. (d) A maturação e o carreamento de antígenos *in vitro* pelas APCs são candidatos vacinais promissores. (e) A vacinação de DNA leva a uma maior eficiência na apresentação de antígenos pelas moléculas de MHC de classe I. (f) O uso de citocinas como adjuvante natural de vacinas. (g) O recrutamento de células NK pode ser relacionado à produção inicial de citocinas do tipo Th1. (h) As vacinas podem atuar no efeito regulatório das células Treg CD4 CD25 visando a quebra da tolerância imunológica. (i) A pré-existência de células T específicas para antígenos expressos por células tumorais não contidos na vacina expande-se após a vacinação, predominando na resposta anti-tumor.

O advento da cultura celular no início do século passado surgiu como um método para estudar o comportamento de células dos animais sem as variações sistêmicas que poderiam surgir no animal tanto durante a homeostase, como durante um estado de estresse de um experimento (Harrison 1910, Carrel 1912 *apud* Freshney 2000b). As culturas de células vêm sendo utilizadas extensivamente para o desenvolvimento e a produção de uma variedade de produtos terapêuticos e profiláticos incluindo hormônios, citocinas, enzimas, antibióticos e vacinas tornando-se, por essa razão, uma ferramenta indispensável para geneticistas, imunologistas, vacinologistas e, especialmente, para a indústria farmacêutica (Freshney 2000a, FDA 2006).

Em 1991, Auwerx comparou diferentes linhagens de células mielóides de origem humana (HL-60, U-937, KG-1, HEL e THP-1) e concluiu que as células THP-1, após o tratamento com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), podem servir de modelo para o estudo *in vitro* dos mecanismos de regulação gênica, funções fisiológicas e diferenciação monócito/macrófago, assim como podem ser utilizadas no estudo dos vários aspectos biológicos do macrófago como o seu papel nos mecanismos de defesa e como célula secretora (Stokes & Doxsee 1999, Medeiros, 2001, Oliveira, Charlab & Pessolani, 2001, Ritelli *et al.* 2003, Theus, Cave & Einsenach, 2004, Berges *et al.* 2005, Zhao *et al.* 2005, Amadori *et al.* 2006).

A célula THP-1 é um monócito obtido a partir do sangue de uma criança com leucemia aguda (Tsuchiya *et al.* 1980, ATCC 2006). Na sua caracterização foi descrito que essas células apresentam capacidade fagocítica, expressão de lisozima e teste negativo para o vírus Epstein-Barr (Tsuchiya *et al.* 1980). Além disso, não possuem atividade citolítica dependente de anticorpo e sua diferenciação pode ser induzida por compostos do tipo ésteres de forbol como, por exemplo, 12-O-tetradecanolforbol-13-acetato (TPA) ou PMA (Tsuchiya *et al.* 1980, Stokes & Doxsee 1999, ATCC 2006).

Theus, Cave & Einsenach (2004) destacaram que as vantagens do uso da linhagem celular THP-1 como modelo de diferenciação monócito/macrófago *in vitro* são a invariabilidade da sua função de macrófago e a reprodutibilidade do crescimento celular o que permite seu estudo em diferentes estágios (normal *versus* ativado). Além disso, foi demonstrado que a diferenciação da THP-1 pode ser utilizada como modelo experimental para maturação de células dendríticas humanas

(Berges *et al* 2005) e como modelo para a avaliação da resposta inflamatória a diferentes ácidos graxos poliinsaturados (Zhao *et al.* 2005).

Stokes e Doxsee (1999) demonstraram que as células THP-1 podem ser utilizadas como modelo para investigar as interações micobacterianas em macrófagos e Medeiros (2001) utilizou-as como substrato para a avaliação da estabilidade estrutural e funcional de cepas de *Mycobacterium bovis* bacilo Calmette-Guérin (BCG) recombinante (BCGr) expressando antígeno de *Bordetella pertussis*. Oliveira, Charlab & Pessolani (2001) compararam o nível de expressão de TNF- α em células THP-1 infectadas com BCG e *Mycobacterium leprae* e, posteriormente, o uso das células THP-1 foi proposto para o desenvolvimento de uma alternativa rápida para a detecção de *M. bovis* no diagnóstico de tuberculose bovina (Ritelli *et al.* 2003, Amadori *et al.* 2006), e como modelo para avaliação da virulência e da persistência intracelular de micobactérias modificadas geneticamente (Lewis *et al.* 2003).

O Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) vem trabalhando desde 1995, com o apoio dos programas PAPES (Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde) e PDTIS (Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e de Bio-Manguinhos, na tecnologia para modificação genética da vacina BCG com o objetivo de desenvolvimento de vacinas vetorizadas contra agentes infecciosos e parasitários. Nesse processo vários cepas de BCG recombinante (BCGr) foram construídas visando a expressão de antígenos protetores de diversos patógenos como *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, o vírus da Hepatite B, entre outros (Medeiros 2001, Santos 2002, Rezende *et al.* 2005, Medeiros *et al.* 2005). Como parte desse mesmo projeto Argondizzo desenvolveu, em 2005, diferentes protótipos vacinais de BCGr expressando a proteína Sm14 de *Schistosoma mansoni* (Figura 1.2) como possíveis alternativas vacinais para a imunoprofilaxia da esquistossomose.

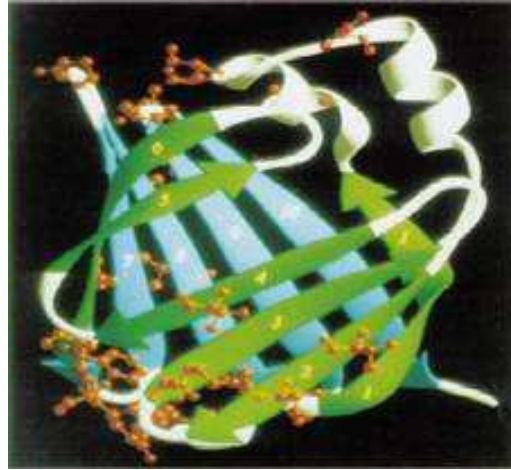


Figura 1.2: Diagrama do modelo molecular da proteína Sm14 (Adaptado de Tendler *et al* 1996)

A esquistossomose é um problema mundial. Estima-se atualmente que pelo menos 200 milhões de pessoas estejam infectados pelo *Schistosoma mansoni* e que mais de 600 milhões de indivíduos estejam em risco no Brasil e no mundo (Argondizzo 2005, Varaldo *et al.* 2006). Dentre as razões para a obtenção de uma vacina efetiva contra o *Schistosoma mansoni* está a elevada frequência da doença na população de muitas regiões, principalmente em países em desenvolvimento, podendo levar os pacientes com a forma hepatoesplênica a um padecimento crônico grave e mortal, sendo assim um grande desafio para a Saúde Pública (WHO 2000). No entanto, a Organização Mundial da Saúde (WHO) através de seu Programa Especial para Treinamento e Pesquisa (TDR), identificou seis antígenos como candidatos para o desenvolvimento de uma vacina. Dentre esses antígenos destaca-se a proteína Sm14, que é uma proteína ligante a ácidos graxos (FABP), de 14 kDa presente no esquistossômulo adulto (Chitsulo *et al.* 2000, WHO 2000, Al-Sherbiny *et al.* 2003).

Na busca de uma vacina candidata contra a esquistossomose, a estratégia de utilização da vacina BCG como vetor para a expressão de antígenos de *S. mansoni* *in vivo* é provavelmente uma das iniciativas mais importantes e de melhor relação custo - benefício no momento para o controle da esquistossomose em países sub-desenvolvidos ou em desenvolvimento (Kremer *et al.* 1998, Dai *et al.* 2003, Varaldo *et al.* 2004, Argondizzo 2005, Varaldo *et al.* 2006). Isso ocorre porque o BCG apresenta um elenco de vantagens de difícil superação entre os vetores vivos atenuados disponíveis no momento, tais como o fato de já ter sido administrado a

bilhões de pessoas no mundo inteiro com baixo índice de efeitos colaterais, poder ser administrado em qualquer época após o nascimento, não ser afetado pelos anticorpos maternos, apresentar baixo custo de produção e ser uma das vacinas mais termoestáveis que se conhece (Smith & Starke 2004, Bonah 2005, SLIPE & API 2005, WHO 2006). Além disso, possui baixo custo de produção, é estável do ponto de vista da atenuação, é controlável por antibióticos, apresenta tropismo por células responsáveis pela montagem da resposta imune (células dendríticas, macrófagos e células linfóides) e é capaz de induzir uma resposta imune celular e humoral contra bactérias, vírus, parasitas e toxinas (Ohara & Yamada 2001, Smith & Starke 2004, SLIPE & API 2005, WHO 2006). Essas características fazem do BCG um dos mais promissores vetores vivos atenuados para uma plataforma vacinal visando a liberação de antígenos heterólogos protetores *in vivo* (Medeiros 2001, Ohara & Yamada 2001, Santos 2002, Smith *et al.* 2001, Argondizzo 2005, Varaldo *et al.* 2004, Varaldo *et al.* 2006).

A capacidade do *M. bovis* BCG sub-cepa Pasteur transformado com plasmídeo pPL73 expressando a proteína Sm14 de *S. mansoni* (BCGr/pPL73-sm14) de induzir efeito protetor semelhante ou maior do que a proteção induzida por três doses da mesma proteína produzida e purificada a partir de *Escherichia coli*, foi avaliada na Fundação Oswaldo Cruz utilizando modelo murino para estudos de proteção, via intraperitoneal, com uma ou duas doses do BCGr/pPL73-sm14, em combinação ou não, com uma dose de reforço da proteína recombinante Sm14 purificada. Nessas condições demonstrou-se que o BCGr/pPL73-sm14 em dose única foi capaz de induzir aproximadamente 50% de proteção. No entanto, apesar dos camundongos vacinados com BCGr/pPL73-sm14 via intraperitoneal não apresentarem anticorpos anti-Sm14, esplenócitos desses animais liberaram IFN- γ quando estimulados com a proteína recombinante Sm14r, sendo assim capaz de induzir níveis de proteção similares àqueles induzidos pela proteína Sm14r, com a vantagem do BCGr/pPL73-sm14 ser administrado em dose única (Varaldo *et al.* 2004).

Apesar da existência na FIOCRUZ de modelo murino de proteção padronizado e aprovado internacionalmente para a avaliação de protótipos vacinais contra a esquistossomose, o grande desafio do projeto para uma nova vacina, com o protótipo BCG/sm14, é a demonstração de proteção em modelo humano. Por essa razão, objetivamos nesse trabalho o desenvolvimento de um protocolo visando o uso de células humanas na avaliação e seleção de vacinas candidatas contra a

esquistossomose. Com essa finalidade, utilizamos como substrato monócitos humanos derivados da linhagem THP-1 para avaliação e quantificação da expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α verificadas após a infecção das células THP-1 com o protótipo vacinal BCG/*sm14*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Demonstrar a viabilidade de um sistema de avaliação *in vitro* para protótipos vacinais baseado no perfil de citocinas expressas pela linhagem celular de monócitos humanos THP-1.

2.2 Objetivos Específicos

- Criar um protocolo de infecção com o *Mycobacterium bovis* BCG em células THP-1
- Avaliar a estabilidade funcional, o grau de infecciosidade e a persistência intracelular do protótipo vacinal BCG/*sm14* em células THP-1
- Avaliar a capacidade do protótipo vacina BCG/*sm14* de induzir a diferenciação e maturação de células THP-1
- Avaliar, quantificar e comparar a expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α após infecção com protótipo vacinal BCG/*sm14* e com os BCGs controles (BCG Pasteur e construção BCG/pAU5) em células THP-1

3. METODOLOGIA

3.1 Cultivo da célula THP-1

A linhagem celular THP-1 (ATCC nº. TIB 202) foi obtida do acervo do Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) de Bio-Manguinhos, Fiocruz mantidos em nitrogênio líquido (-196°C) por no máximo de 12 meses. As células foram descongeladas de criotubos Posteriormente, foram realizadas três lavagens com PBS [137mM de NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 2.7mM KCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 10mM Na₂HPO₄ (Merck) e 1.8mM KH₂PO₄ (Merck)] 1X pH 7.4. Para a manutenção celular foram testados, diversos meios de cultura (MEM, D-MEM e RPMI 1640) e suplementos [soro fetal bovino inativado – SFB (Gibco Life Technology / Invitrogen, Grand Island, EUA), HEPES (Gibco), L-glutamina Sigma-Aldrich), NaHCO₃ (Merck), 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), piruvato de sódio (Sigma-Aldrich), estreptomicina/penicilina (Gibco), gentamicina (Gibco)]. Após observação morfológica das células por microscopia óptica (400 x), definiu-se que para os experimentos propostos seria utilizado o meio de cultura foram cultivadas inicialmente em meio RPMI 1640 (Gibco) formulado com 0,2% (v/v) de NaHCO₃ (Sigma-Aldrich), suplementado com 20% (v/v) de SFB e mantidas em garrafas T de 25 cm² (Corning, Corning, EUA) a 37°C em atmosfera com 5% de gás carbônico (CO₂) por 3 dias.

Quando da necessidade de se ampliar o acervo desta linhagem, as células foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos, lavadas duas vezes em PBS e ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB. A concentração e viabilidade celular foram determinadas em hemocítmetro por microscopia óptica (100 x) utilizando-se a diluição de 1:50 em azul de tripan 0,4% (Gibco). Para a criação dos lotes de trabalho, após as etapas de centrifugação e lavagem, as células foram ressuspensas na concentração de 1 x 10⁷ células/mL em solução de criopreservação [90% SFB e 10% dimetil sulfoxido (DMSO - Sigma-Aldrich)] e mantidas em nitrogênio líquido a – 196°C.

No preparo das células para a realização dos experimentos, as células foram removidas do meio de cultura original, lavadas duas vezes em PBS, ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB. Após a quantificação as células foram ressuspensas na concentração de 1 x 10⁶ células/mL em RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB.

3.2. Cultivo das cepas de BCG

Para a presente proposta foi utilizado o protótipo vacinal *M. bovis* BCG sub-cepça Pasteur 1173P2 transformada com o vetor plasmidial pAU5 contendo o gene *sm14* de *S. mansoni* (BCG/*sm14*). Como controle dos experimentos, foram utilizados a amostra vacinal *M. bovis* BCG sub-cepça Pasteur 1173P2 (BCG-P), assim como o *M. bovis* BCG sub-cepça Pasteur transformado o plasmídeo pAU5 (BCG/pAU5). Os BCGs recombinantes foram desenvolvidos no LATER pelos pesquisadores Dr. Douglas MacIntosh e Msc. Ana Paula C. Argondizzo (Argondizzo 2005) (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Características das cepas de BCG

Cepas	Características
BCG-P	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepça Pasteur 1173P2
BCG/pAU5	<i>M. bovis</i> BCG sup-cepça Pasteur Vetor pAU5: <i>kanR</i> , <i>oriE</i> , <i>oriM</i> , <i>Phsp60</i> *
BCG/ <i>sm14</i>	<i>M. bovis</i> BCG sub-cepça Pasteur Vetor pAU5/ <i>sm14</i> : <i>kanR</i> , <i>oriE</i> , <i>oriM</i> , <i>Phsp60</i> *, <i>sm14</i>

pAU5 - vetor de expressão citoplasmático

kanR - gene de resistência à canamicina derivado do Tn903

oriE - origem de replicação do bacteriófago T4 de *Escherichia coli*

oriM - origem de replicação do plasmídeo pAL5000 de *Mycobacterium fortuitum*

*Phsp60** - promotor *hsp60* de *Mycobacterium bovis* BCG modificado

sm14: gene de *Schistosoma mansoni*

Os BCGs foram estocados em alíquotas e armazenados a -70°C. No momento do uso as alíquotas foram descongeladas e cultivadas em 20 mL de caldo Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA) suplementado com 10% (v/v) da solução Albumina – Dextrose – Catalase (ADC - Difco), 0,05% (v/v) de Tween 80 (Merck) e 0,2% (v/v) de glicerol (Sigma-Aldrich) a 37⁰ C e 5% CO₂ por 10 dias, quando atingem a fase exponencial de crescimento.

Para o preparo dos inóculos, o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG e BCG-pAU5) foram obtidos a partir de culturas em fase exponencial. Os BCGs foram

centrifugados a 1950 x g e lavados duas vezes em PBS. Após a lavagem, a concentração de cada amostra de BCG foi ajustada com PBS para o padrão 1 da escala de MacFarland (MacFarland, 1907), ou seja, $3,0 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro. Uma alíquota de 10 μ L desta suspensão bacteriana foi quantificada em hemocitômetro por microscopia ótica (100x), para confirmação da leitura por turbidez.

Devido à dificuldade para a determinação da viabilidade dos BCGs em UFC utilizando o meio Middlebrook 7H10 (Difco) suplementado com 10% (v/v) de ADC preparado no laboratório, buscaram-se diferentes alternativas, como a substituição do lote do meio Middlebrook 7H10, utilização do meio Middlebrook 7H11 e suplementação dos meios com ADC e OADC comercial (Difco).

Em cada experimento, o número de bactérias viáveis foi determinado através de plaqueamento de diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) em triplicata, em meio ágar Middlebrook 7H11 (Difco) suplementado com 10% (v/v) da solução de Ácido oléico - Albumina - Dextrose - Catalase (OADC – Difco) e 0,2% (v/v) de glicerol. As placas foram incubadas por quatro semanas em estufa a 37°C em 5% CO₂.

3.3 Avaliação da expressão da proteína recombinante Sm14 em BCG/sm14

Para a confirmação da expressão da Sm14 pela cepa BCG/sm14 foi utilizado a técnica de *western blotting* com base no protocolo descrito por Argondizzo (2005). Amostras de 4 mL das culturas bacterianas foram centrifugadas por 5 minutos a 6500 x g a temperatura ambiente sendo o precipitado rompido por lise mecânica utilizando-se 0,5 g de pérolas de vidro de 0,5 mm de diâmetro (BioSpec Products – Bartlesville, EUA), 60 μ L de tampão Tris-HCl 1 mM 50 mM pH 6.8 e 20 μ L de tampão de amostra 4X (Tris-HCl 50mM pH 6,8, DTT 100mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%). As amostras foram agitadas inicialmente por 45 segundos sendo colocadas em gelo por um minuto e posteriormente agitadas por 30 segundos, utilizando-se o aparato “Mini Beadbeater” (Biospec Products, Bartlesville, Canada). Em seguida, as amostras foram fervidas por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida 13,5% [técnica de SDS-PAGE (Laemmli 1970)] com espaçador de 1 mm. A corrida foi realizada a 100 volts, no gelo. O material do gel foi transferido para membrana de duralose (Duralose – UVTM Membranes – Stratagene, La Jolla, CA, EUA), sendo a transferência realizada por 90 minutos a 90 volts, no gelo.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada em solução de 3% (p/v) de albumina bovina (BSA - Sigma-Aldrich) em PBS pH 7.4 com 0,02% (v/v) de Tween 20 (PBS-T) por um período de 2 horas a temperatura ambiente e sob leve agitação. A seguir a membrana foi incubada com o anticorpo primário policlonal anti-Sm14 (produzido em coelhos New Zealand no Laboratório de Esquistossomose Experimental, Departamento de Helminologia, IOC, FIOCRUZ), diluído 1:500 ou 1:1000. A membrana foi incubada com o anticorpo primário a temperatura ambiente por um período de 16 a 18 horas (*overnight*), a seguir a membrana foi lavada duas vezes com PBS-T por cerca de 40 minutos e duas vezes com PBS pelo mesmo tempo. O anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich), foi diluído na razão 1:30.000 em PBS-T e a membrana incubada por 2 horas sob agitação leve a temperatura ambiente. A seguir procederam-se novamente as lavagens como descrito anteriormente. Após as lavagens, a membrana foi revelada com 5 mL da solução “Western Blue^R Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase” (Promega, Madison, EUA).

3.4 Padronização da multiplicidade de infecção (MOI) do BCG-P

No intuito de verificar a produção de citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α por células THP-1 induzidas por diferentes inóculos de BCG-P, as células foram infectadas numa relação de 5, 10 ou 50 UFC de BCG para cada célula THP-1. Para este ensaio foram definidos apenas dois tempos de infecção: 4 e 24 horas. Foram incubadas 1×10^6 células THP-1 com 5×10^6 , 1×10^7 ou 5×10^7 de BCG-P, em triplicata, mantidos em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB em tubos cônicos de 1,5 mL e incubadas por 4 horas, sob agitação (120 rpm) a 37°C em ambiente com 5% CO₂.

Após este período, as amostras foram centrifugadas a 400 x g e lavadas três vezes com PBS. Após a lavagem, as amostras referentes a avaliação de 4 horas de infecção foram homogeneizadas com 1 mL de meio RPMI 1640, sendo retirados 100 μ L para a recuperação dos BCGs intracelulares, e 900 μ L para avaliação da expressão de citocinas secretadas por células THP-1 infectadas com BCG pela técnica de citometria de fluxo. Já as amostras de 24 horas de infecção, foram homogeneizadas com 1 mL de meio RPMI 1640 com 10% (v/v) de SFB e incubados, sob agitação (120 rpm) a 37°C em ambiente com 5% CO₂ até o término do tempo

proposto (24 horas) sendo posteriormente processadas da mesma forma que as amostras de 4 horas.

Para o acompanhamento da viabilidade dos BCGs intracelulares, nos 100 µL retirados das amostras, foram adicionados 900 µL de tampão PBS com 0,1% (v/v) de Tween 80 (Pro Analysis, Rio de Janeiro) e centrifugados por 10 minutos a 6500 x g, para lisar as células THP-1 e obter os BCGs antes internalizados. O precipitado então foi diluído em 100 µL de meio Middlebrook 7H9 e plaqueado em meio Middlebrook 7H11 para determinação de UFC, como descrito no item 3.2.

3.5 Infecção do BCG/*sm14* e BCGs controles em células THP-1

Os experimentos envolvendo a produção de citocinas em células THP-1 infectadas com BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5) foram realizados como descrito no item 3.4, utilizando MOI de 10 micobactérias para 1 célula THP-1 nos tempos de 4, 24 e 48 horas pós-infecção. Para a análise do perfil de citocinas expressas pela célula THP-1 infectada com as diferentes amostras de BCG utilizaram-se as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo.

3.6 Avaliação da capacidade de proliferação celular da célula THP-1

Para avaliar a capacidade de replicação e a viabilidade celular das células THP-1 infectadas com BCG/*sm14* e os BCGs controles, um cultivo celular foi estabelecido por um período de 24 e 48 horas após a infecção. As células THP-1 foram infectadas com MOI de 10 micobactérias para 1 célula THP-1 como descrito no item 3.3. As amostras contendo $2,5 \times 10^5$ células THP-1 infectadas ou não com os BCGs, foram suspensas em 100 µL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SFB por poço em placas de 96 poços. Dezesesseis horas antes do término do tempo de infecção, foi adicionado 1µCi de timidina tritiada (Timidina-H³ - Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA) por poço e as placas foram mantidas em estufa a 37°C em ambiente com 5% CO₂. Ao término dos tempos de infecção (24h e 48h) as placas foram congeladas a -20°C até a realização da leitura.

No dia de leitura, as placas foram descongeladas a temperatura ambiente e as amostras foram transferidas através do coletor de células (Cell Harvester - Skation Instruments AS, Lier, Noruega) para o papel de filtro (FilterMAT - Skation Instruments AS). As amostras no papel de filtro foram colocadas em tubos de

cintilação sendo adicionado 1 mL por tubo de solução de cintilação [Difeniloxazol (PPO - Merck), Bis-feniloxazolilbenzeno (POPOP - Merck), Tolueno (Merck)]. As amostras foram contadas em espectrômetro de cintilação líquida (TRI-CARB® 1600 CA, Packard, Milano, Itália) e o resultado expresso em contagem por minuto (cpm).

3.7 Avaliação da estabilidade funcional (expressão do gene *kanR*) do vetor de expressão pAU5 dos BCGr

A confirmação das cepas recombinantes de BCG transformadas com os plasmídeos pAU5 e pAU5-*sm14* foi determinada através do plaqueamento de diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}), em triplicata, dos inóculos utilizados para infecção e dos BCGs recuperados das células THP-1 nos diferentes tempos de infecção (descrito no item 3.4), em meio ágar Middlebrook 7H11 suplementado com 10% (v/v) de OADC e 0,2% (v/v) de glicerol, adicionado ou não de 25 µg/mL de canamicina (Kan - Sigma-Aldrich), para a avaliação da expressão do gene *kanR* contido no vetor de expressão pAU5. As placas foram incubadas por quatro semanas para determinação de UFC em estufa a 37°C em ambiente com 5% CO₂.

3.8 Protocolo de imunocitoquímica para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1

As amostras das células THP-1 infectadas com o BCG/*sm14* e os BCGs controles foram removidas 4, 24 e 48 h após a infecção, centrifugadas a 400 x g, lavadas três vezes com PBS e mantidas em 1mL de PBS.

Utilizando uma centrífuga citológica (Citospin modelo 2400 – Fanem, São Paulo), as células foram transferidas para lâminas de microscopia (Solidor – Médico International Trading Co, Tianjin, China) previamente tratadas com 2 % (v/v) de silano (Sigma-Aldrich) em acetona PA (Merck). De cada amostra, foram adicionados 150 µL em cada orifício seguido de centrifugação a 1800 rpm por 3 minutos.

As células foram fixadas com 4% de paraformaldeído pH 7,4 (Sigma-Aldrich), por 15 minutos, e lavadas em tampão Tris base salina (TBS) com 0,2% (v/v) de Tween20 (Merck), pH 7,4 10 mM (TBS-T) por 10 minutos. A seguir, foram adicionados 50 µL de SFB diluído em TBS-T (1:100) por 30 minutos, com o objetivo de impedir ligações inespecíficas. Após a remoção do soro, foram adicionados 50 µL

dos anticorpos monoclonais primários (Tabela 3.2) diluídos em TBS-T. As lâminas foram incubadas em câmara úmida *overnight* a 4°C.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com TBS-T (3 banhos por 5 minutos cada) e incubadas com 50 µL de anticorpo secundário biotilado (Tabela 3.1). Após 30 minutos, as lâminas foram lavadas com TBS-T em três banhos por 5 minutos cada e foram adicionados 50 µL do complexo estreptoavidina-peroxidase (Dako, Glostrup, Dinamarca) por 30 minutos em câmara úmida, lavando-se em seguida três vezes por 5 minutos cada com TBS-T. Para a revelação, foram adicionados 50 µL em cada amostra da solução de 3-3' diaminobenzidina (DAB - Dako) sendo acompanhada a conversão da tonalidade em microscópio óptico (400 x). A reação foi finalizada mergulhando as lâminas em água destilada e, posteriormente, em água corrente. A seguir, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer (Dako) por 2 minutos, e posteriormente lavadas em água corrente. Logo após, as lâminas foram desidratadas em etanol (Merck) por 10 minutos, diafanizadas em xilol (Merck) por 10 minutos e montadas em “Faramount Mounting Medium, Aqueous” (Dako) entre lamínulas (Corning).

O percentual de células, expressando as citocinas IL-10, IL-12 e TNF-α após infecção com BCG/*sm14*, BCG-P ou BCG/pAU5 por 4, 24 e 48 horas foi determinado pela contagem de células positivas em um campo de duzentas células, utilizando microscopia óptica (1000x).

Tabela 3.2: Anticorpos utilizados no protocolo de imunocitoquímica

Anticorpo Primário	Origem	Diluição	Empresa	Anticorpo Secundário
anti-IL-10 humana	Rato	1:75	Mabtech AB Nacka Strand, Suécia	Coelho anti-rato (Dako)
anti-IL-12 (p70) humana	Camundongo	1:200	Mabtech AB Nacka Strand, Suécia	Kit LSAB – anti-camundongo, anti-coelho e anti-cabra (Dako)
anti-TNF-α humana	Cabra	1:25	R&D Systems Minneapolis, USA.	Kit LSAB – anti-camundongo, anti-coelho e anti-cabra (Dako)

3.9 Protocolo de citometria de fluxo para avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção com BCGs em células THP-1

Os experimentos envolvendo a produção de citocinas em células THP-1 mediada pela infecção com BCG/*sm14* e os BCGs controles foram realizados como descrito no item 3.5. Nas amostras onde a infecção ocorreu por 24 horas e 48 horas foram adicionadas 1 μL de brefeldina A (BD Biosciences / Becton Dickinson & Company, San Diego, EUA) 4 horas antes do término de cada tempo de infecção, atuando na inibição do complexo de Golgi por este ser o principal centro de distribuição da célula, visando o acúmulo de citocina no interior da célula.

As amostras foram ressuspensas em 50 μL da solução *Cytofix/Cytoperm* (BD Biosciences), homogeneizadas no agitador de tubos (Fanem) e incubadas por 20 minutos em gelo. Em seguida foram adicionados 150 μL de PBS, as amostras foram centrifugadas por 10 segundos a 6500 x *g* e ressuspensas em 200 μL tampão *Perm/Wash* 1X (BD Biosciences) adicionado com 10% (v/v) de soro AB humano (Sigma-Aldrich). Os anticorpos (Tabela 3.2) diluídos no tampão *Perm/Wash* adicionado com 10% (v/v) de soro AB humano foram adicionados as amostras e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram lavadas uma vez com 400 μL de *Perm/Wash* e uma vez com 400 μL PBS.

A leitura das amostras foi realizada no citômetro Coulter EPICS XL-MCL (Beckman Coulter, Fullerton, EUA), utilizando o filtro *Band Pass* (BP) de 525 nm para a leitura dos anticorpos marcados com fluorocromo Ficoeritrina (PE) e o filtro BP de 575 nm para leitura do anticorpo marcado com fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Tabela 3.3) e analisadas no programa WinMDI versão 2.8. A seleção da região de interesse (R1) foi realizada em gráficos de distribuição em pontos de tamanho celular relativo (*Foward angle light scatter* - FSC) versus granulosidade celular (*Side angle light scatter* - SSC), de onde foram excluídos tanto restos como grumos celulares, sendo analisado um mínimo de 20 mil eventos por amostra.

Tabela 3.3: Anticorpos utilizados no protocolo de citometria de fluxo

Anticorpo Primário	Origem	Diluição	Empresa	Fluorocromo	Filtros (Band Pass)
anti-IL-10 humana	Rato	1:200	BD Biosciences	PE	575 nm
anti-IL-12 (p70) humana	Camundongo	1:200	BD Biosciences	PE	575 nm
anti-TNF- α humana	Camundongo	1:800	BD Biosciences	FITC	525 nm

4. RESULTADOS

4.1 Cultivo da célula THP-1

Para a padronização da manipulação da célula THP-1 foram determinados parâmetros para o meio de cultivo e manutenção.

4.1.1 Meios de cultivo.

Foram testados, diversos meios de cultura (MEM, D-MEM e RPMI 1640) e suplementos (SFB, HEPES, L-glutamina, NaHCO_3 , 2-mercaptoetanol, piruvato de sódio, estreptomicina/penicilina, gentamicina) e após observação morfológica das células por microscopia óptica (400 x), definiu-se que para os experimentos propostos seria utilizado o meio de cultura RPMI preparado com 0,2% (v/v) de NaHCO_3 , sendo suplementado com SFB nas concentrações de 20% para o descongelamento e 10% para a manutenção e experimentos. O uso de outros suplementos de crescimento como piruvato de sódio e 2-mercaptoetanol não se mostraram necessários (dados não mostrados).

4.1.2 Manutenção

A manutenção da célula THP-1 foi realizada a cada 3-4 dias, contudo, foi estipulado após observação morfológica, que os experimentos seriam realizados com células que estivessem na terceira ou quarta passagem (Figura 4.1). Da mesma forma, para a criação dos lotes de trabalho e reposição do acervo, as células THP-1 seriam mantidas até a oitava passagem.

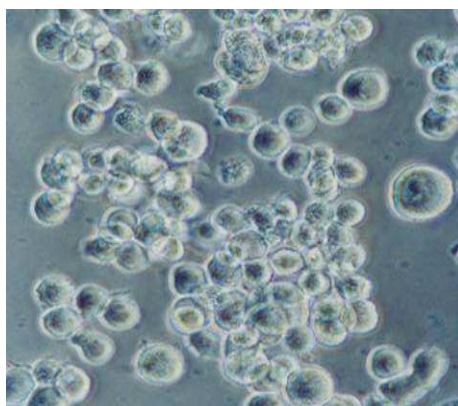


Figura 4.1 Microscopia óptica (200 x) de células THP-1, após três passagens, mantidas em meio RPMI 1640 preparado com 0,2% de NaHCO_3 e suplementado com 10% de SFB.

4.2. Cultivo das cepas de BCG

Para o cultivo das cepas BCG-P, BCG/pAU5 e BCG/sm14 foi utilizado a metodologia usualmente aplicada no LATER (Medeiros 2001, Santos 2002, Argondizzo 2005). Entretanto devido à dificuldade para a determinação da viabilidade dos BCGs em UFC utilizando o meio Middlebrook 7H10 (Difco) suplementado com 10% (v/v) de ADC preparado no laboratório, buscaram-se diferentes alternativas, como a substituição do lote do meio Middlebrook 7H10, utilização do meio Middlebrook 7H11 e suplementação dos meios com ADC e OADC comercial (Difco).

A quantificação dos BCGs obtida, em UFC, após o plaqueamento em diferentes formulações dos meios Middlebrook 7H10 e 7H11, foi confrontada com a quantificação das amostras em hemocitômetro e no ajuste ao padrão 1 do sistema de McFarland. Os resultados demonstraram que os BCGs cultivados em meio Middlebrook 7H11 preparado com 0,2% de glicerol e suplementado com 10% de OADC (Figura 4.2) obtiveram a mesma quantidade de UFC que as amostras ajustadas ao padrão 1 do sistema de McFarland e quantificadas em hemocitômetro.

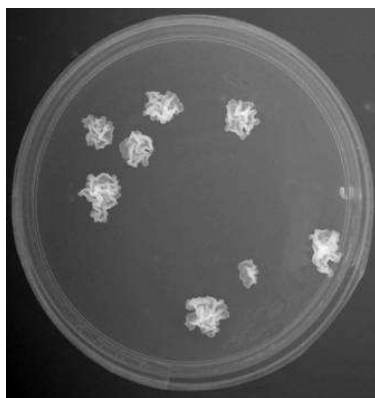


Figura 4.2 Cultura de *M. bovis* BCG Pasteur em meio 7H11 suplementado com 10% de OADC.

4.3 Expressão da proteína Sm14 pelo BCG/*sm14*

A técnica de *Western blot* foi empregada para avaliar a expressão da proteína Sm14 pelos quatro clones da construção BCG/*sm14* utilizados nos experimentos de infecção em células THP-1.

Foi utilizada como padrão (P), 20 ng da proteína Sm14r produzida em *E.coli*, gentilmente cedida pela Dr^a. Miriam Tendler (Laboratório de Esquistossomose Experimental – IOC/Fiocruz) onde em virtude do aquecimento observam-se duas bandas, referentes à proteína Sm14r e seu dímero. Nas linhas 1 a 4 foram aplicados como controle, amostras de 4 clones de BCG/pAU5, onde se observam bandas inespecíficas. Nas linhas 5 a 8 foram aplicadas amostras de 4 clones de BCG/*sm14*, destacando-se em vermelho as bandas correspondentes a proteína Sm14r produzida em BCG, sendo visualizado também o dímero dessa proteína (Figura 4.3).

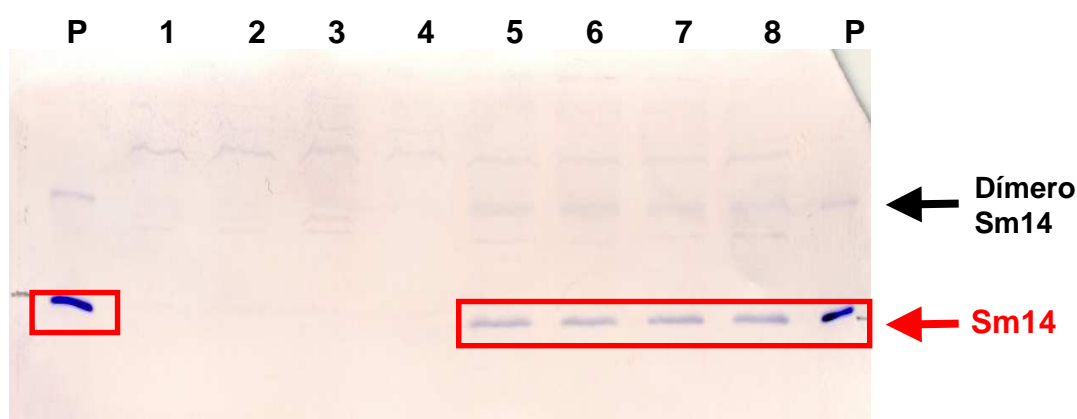


Figura 4.3 Expressão da proteína Sm14 produzida pelos quatro clones de BCG/*sm14* utilizados nos experimentos de infecção (linhas 5-8). Como controle foram usados 20 ng da proteína Sm14 (indicada pela letra P) e as proteínas totais dos quatro clones de BCG/pAU5 utilizados nos experimentos de infecção (linhas de 1-4).

4.4 Multiplicidade de infecção (MOI) BCG:THP-1

Para a determinação da melhor relação micobactéria-célula THP-1 a ser utilizada para se testar os BCG recombinantes, foi utilizada a quantificação da expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α , após 4 e 24 horas de infecção pela técnica de citometria de fluxo. Foi realizado um experimento onde foram testadas três relações micobactéria-célula THP-1: 5, 10 e 50 células de BCG-P para cada célula THP-1. Os resultados evidenciados e demonstrados na figura 4.4, indicam

que um percentual pequeno de células THP-1, mesmo sem estímulos, é capaz de secretar essas citocinas em nível basal (2,9%, 5,3%, 3,0% para IL-10, IL-12 e TNF- α , respectivamente). Estes percentuais permanecem estáveis após 4 horas de infecção com o BCG-P. Entretanto, após 24 horas de infecção com BCG-P, o percentual de células secretando IL-10 foi de 4,8%, 13,4% e 5,7% quando infectadas respectivamente por 5, 10 e 50 micobactérias-célula THP-1, indicando que para esta citocina a melhor relação micobactéria-célula THP-1 é de 10:1 (Figura 4.2). Para IL-12 foi possível observar que 4,8%; 12,7% e 6,1% das células infectadas expressavam esta citocina em resposta à mesma relação micobactéria-célula THP-1. Contudo, observamos um perfil diferente quanto à secreção de TNF- α , 10,5%, 5,97% e 4,23%, indicando que a melhor dose resposta foi obtida com a relação de 5 micobactérias-célula THP-1.

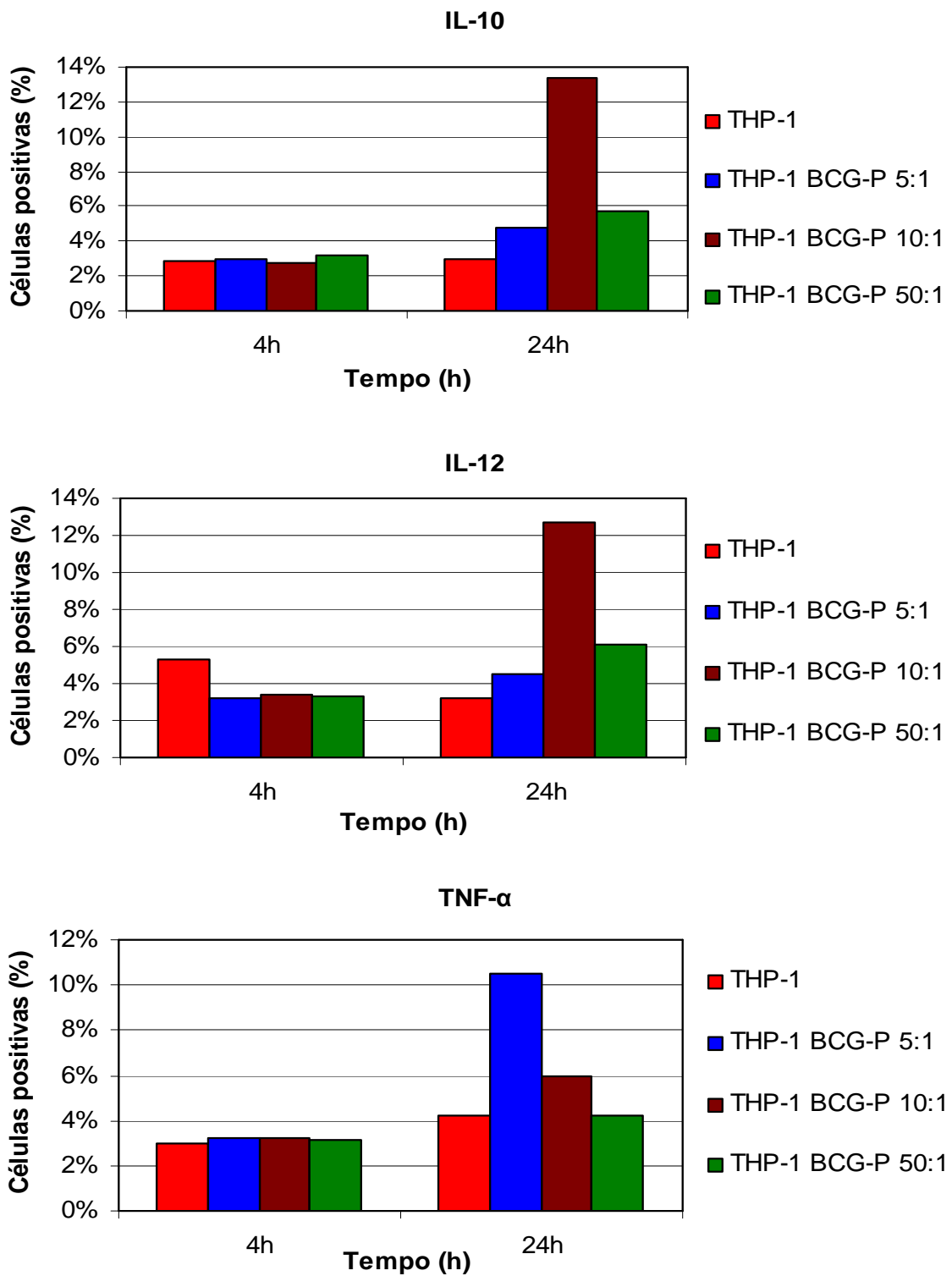


Figura 4.4. Expressão de IL-10, IL-12 e TNF- α em células THP-1 infectadas com *M. bovis* BCG sub-cepa Pasteur 1173P2 utilizando diferentes relações micobactéria-célula.

4.5 Capacidade de proliferação da célula THP-1 infectada pelo BCG/*sm14* e BCGs controles

A avaliação da capacidade de replicação das células THP-1 infectadas ou não pelo BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5) foi realizada pela técnica de proliferação celular através da absorção de timidina tritiada (cintilação). Os resultados obtidos em um experimento demonstram que as células THP-1 tiveram seu crescimento celular reduzido em mais de dois \log_{10} , 24 e 48 horas após a infecção com o BCG/*sm14* e os BCGs controles, não havendo diferença entre os BCGs. Os resultados indicam que a linhagem monocítica THP-1 tem sua diferenciação celular interrompida após infecção com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (Figura 4.5).

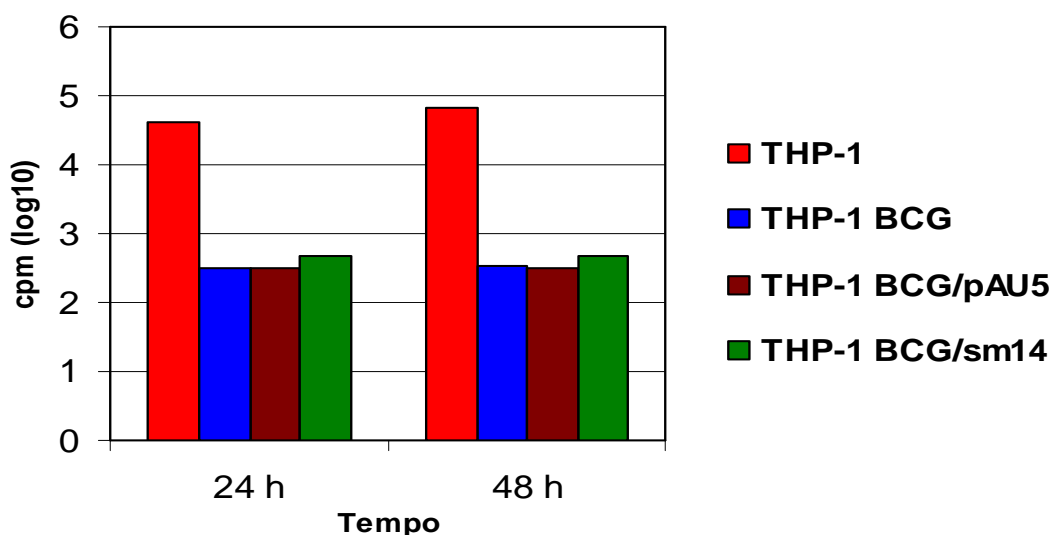


Figura 4.5: Atividade proliferativa das células THP-1 infectadas pelo BCG/*sm14* e pelos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5). Os resultados estão expressos em contagem por minuto (cpm).

4.6 Avaliação da viabilidade e estabilidade funcional (expressão do gene *kanR*) dos BCG/*sm14* e BCGs controles recuperados das células THP-1

A capacidade de infecção e manutenção do crescimento intracelular dos BCGs foi realizada em paralelo aos três experimentos de infecção com as cepas de BCG em células THP-1. A determinação comparativa das UFC dos cultivados em meio 7H11 seletivo (com canamicina – 7H11/Kan) e meio 7H11 não seletivo, permitiu avaliar a estabilidade funcional dos BCGs recombinantes (Figura 4.6).

Foi possível observar que de 3 a 7,5% dos BCGs não foram capazes de penetrar ou permanecerem aderidos a membrana das células THP-1, pois após 4 horas de infecção houve uma redução no número de bacilos utilizados para a infecção (tempo 0). Praticamente não houve diferença entre o número de bacilos recuperados entre o BCG/*sm14* e os BCGs controles, indicando que a presença do plasmídeo não alterou a capacidade dos BCGs recombinantes de penetrarem na célula.

Da mesma forma não observamos diferença entre os BCG/*sm14*, BCG-P e BCG/pAU5 quanto a capacidade de multiplicação intracelular, visto a manutenção entre o número de UFC recuperadas após 24 horas ($5,4 \log_{10}$, $5,7 \log_{10}$ e $5,4 \log_{10}$) e 48 horas ($5,3 \log_{10}$, $5,6 \log_{10}$ e $5,2 \log_{10}$). Uma redução entre 0,1 e $0,3 \log_{10}$ foi observada entre o período basal de 4 horas e após 24 e 48 horas.

Na avaliação da estabilidade funcional dos BCGs recombinantes, observamos que não houve diferença expressiva entre o cultivo dos BCG/*sm14* e BCG/pAU5 nos meios Middlebrook 7H11 e 7H11/Kan em todos os tempos avaliados. Como controle do meio seletivo, foram plaqueadas amostras de BCG, não sendo observado nenhum crescimento.

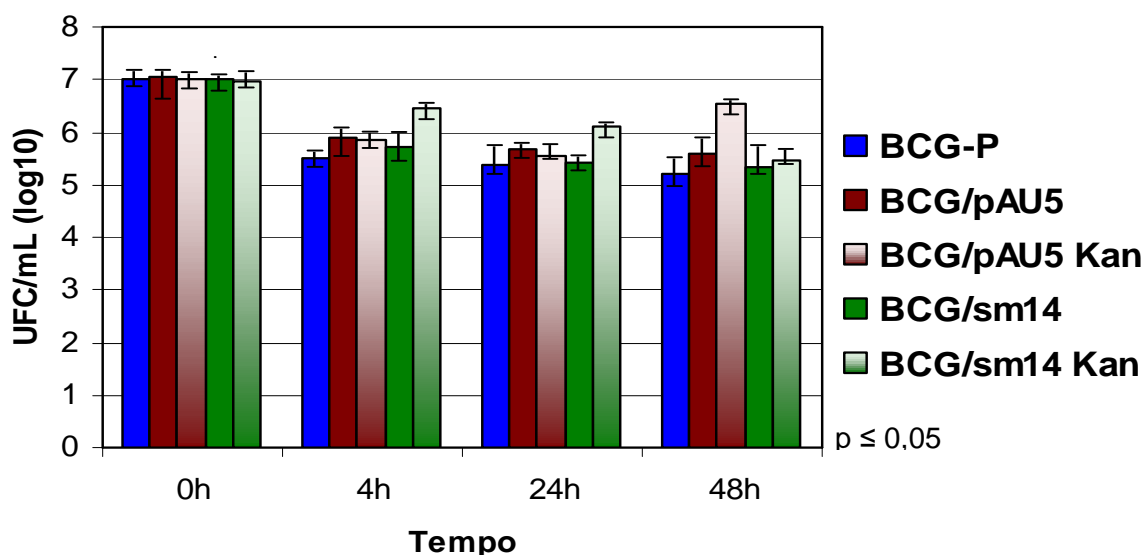


Figura 4.6 Gráfico da cinética da viabilidade do protótipo vacinal BCG/sm14 e dos BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), recuperados de células THP-1 e cultivados nos meios Middlebrook 7H11 e 7H11/Kan (Três experimentos em triplicata).

4.7. Avaliação da expressão de citocinas a partir da infecção do BCG/sm14 e BCGs controles em células THP-1 por imunocitoquímica

Para a detecção intracelular das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α produzidas pela infecção com BCG/sm14, BCG-P e BCG/pAU5 nas células THP-1 pela técnica de imunocitoquímica, com base na dissertação da Msc. Ana Teresa Gomes Fernandes (Fernandes 2003). Devido às dificuldades de adaptação deste procedimento à técnica de imunocitoquímica, foram avaliados diferentes parâmetros como condições de incubação dos anticorpos primários (1 hora a 25°C ou *overnight* a 4°C), tampões (HBSS, TBS-T, PBS-Saponina) e fixadores (paraformaldeído 4% ou acetona PA). Após observação morfológica por microscopia óptica (1000 x), determinou-se que os anticorpos primários deveriam ser incubados com as amostras a 4°C por 16-18 horas (*overnight*), sendo utilizado o tampão TBS-T e as amostras fixadas com paraformaldeído 4%.

Foi possível identificar por esta metodologia a produção de citocinas pelas células THP-1 (Figura 4.7). O percentual de células expressando cada citocina foi determinado após 4, 24 e 48 horas de infecção pelo BCG-P, BCG/pAU5 e BCG/sm14 através da média de três experimentos, sendo demonstrado o desvio padrão pela barra de erro. A expressão basal destas citocinas foi também determinada em células não infectadas, onde se observou que a citocina IL-10 foi

expressa por 5,0%, 10,7% e 6,4% das células THP-1, sendo que 8,8%, 8,2% e 3,4% produziram IL-12 e 3,6%, 6,5% e 2,2% expressaram TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente. Após a infecção com BCG-P, 5,9%, 6,5% e 5,5% expressavam IL-10; 9,45%, 4,6% e 6,1% expressaram IL-12 e 6,8%, 6,4% e 5,2% TNF- α , durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente. Na infecção de células THP-1 com o recombinante controle BCG/pAU5, 7,3%, 9,9% e 2,9% expressaram IL-10, na produção de IL-12 foram observados 9,9%, 8,3% e 7,1% de células e 4,1%, 5,5% e 1,5% de células produziram TNF- α . Durante a infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, foram detectadas 5,3%, 9,3% e 6,2% de células expressando IL-10; 9,4%, 10,4% e 4,3% de células produtoras de IL-12 e 4,5%; 7,1% e 6,0% de células fabricantes de TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente (Figura 4.7).

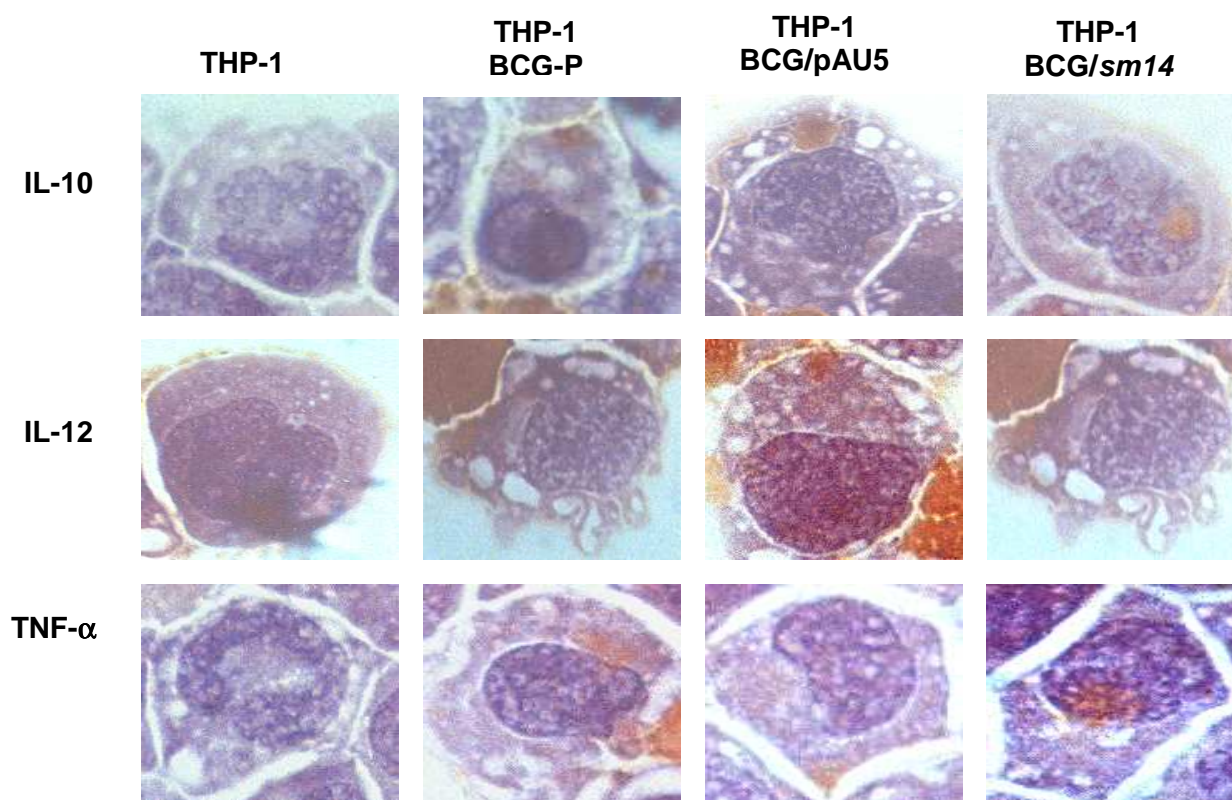


Figura 4.7 Microscopia óptica (1000 x) de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após 24 horas de infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), detectadas por imunocitoquímica.

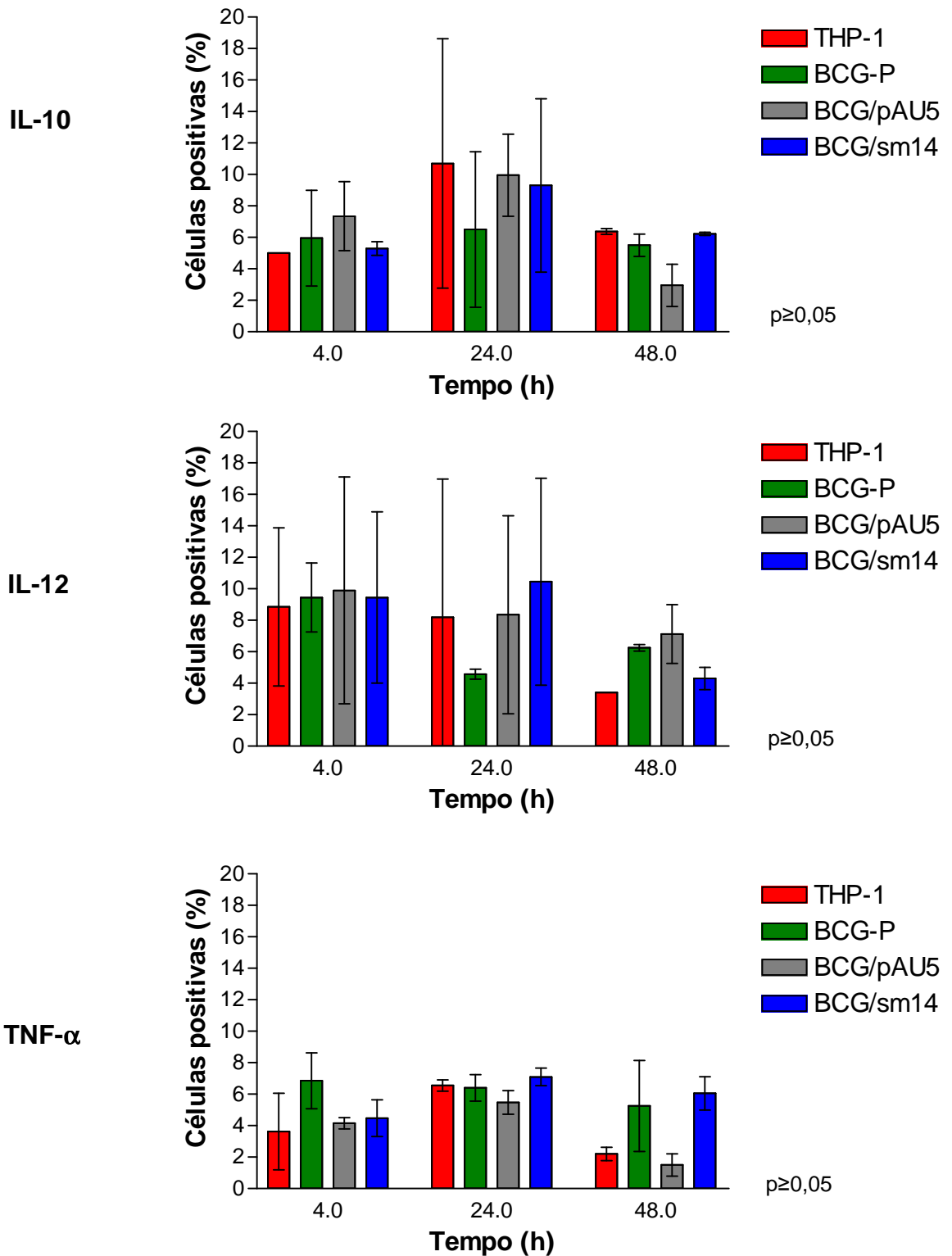


Figura 4.8 Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 e TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por imunocitoquímica (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

4.8 Avaliação das citocinas a partir da infecção do BCG/*sm14* e BCGs controles em células THP-1 por Citometria de Fluxo

Para a detecção intracelular das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α produzidas pela célula THP-1 e pela infecção com BCG/*sm14*, BCG-P ou BCG/pAU5 em células THP-1 pela técnica de citometria de fluxo, inicialmente foi determinada a região de análise a partir da leitura de uma amostra das células THP-1 incubada a 37°C em ambiente com 5% CO₂ por 4 horas, sendo comparada a relação tamanho/granulosidade, objetivando excluir tanto restos celulares quanto grumos celulares (Figura 4.8).

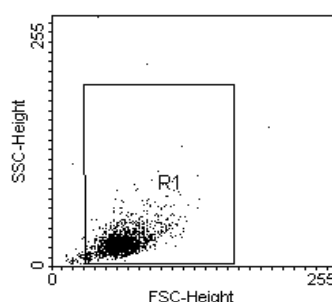


Figura 4.9 Determinação da região de análise das células THP-1 mantidas em cultivo celular. A região de análise (R1) foi determinada excluindo-se os restos celulares. Pode-se observar uma grande variabilidade quanto ao tamanho das células, visto se tratar de células em diferenciação.

Os resultados estão expressos nas figuras 4.9 a 4.12, mostrando a média de três experimentos, sendo evidenciado o desvio padrão pela barra de erro. Na detecção da produção de citocinas pelas células THP-1 sem estímulos, observou-se que a citocina IL-10 foi expressa por 3,2%, 8,1% e 11,4% das células THP-1, sendo que 2,7%, 4,6% e 8,1% das células THP-1 produziram a citocina IL-12 e 3,0%, 5,9% e 5,4% das células THP-1 expressaram TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas.

A infecção com BCG-P em células THP-1 gerou durante os tempos de infecção, 3,3%, 6,9% e 13,4% de células produtoras de IL-10; 2,0%, 5,5% e 12,0% de células expressando IL-12 e 4,2%, 5,4% e 11,4% de células sintetizando TNF- α .

Na infecção com o controle BCG/pAU5 em células THP-1, 3,3%, 6,2% e 12,3% expressaram IL-10, na produção de IL-12 foram detectados 4,3%, 4,6% e 10,2% de células e 4,0%, 3,9% e 11,3% de células produziram TNF- α .

Durante a infecção do BCG/*sm14* em células THP-1, foram detectados 3,2%, 7,9% e 12,9% de células expressando IL-10; 3,1%, 4,8% e 9,0% de células produtoras de IL-12 e 2,7%, 3,4% e 11,4% de células fabricantes de TNF- α durante os tempos de 4, 24 e 48 horas, respectivamente.

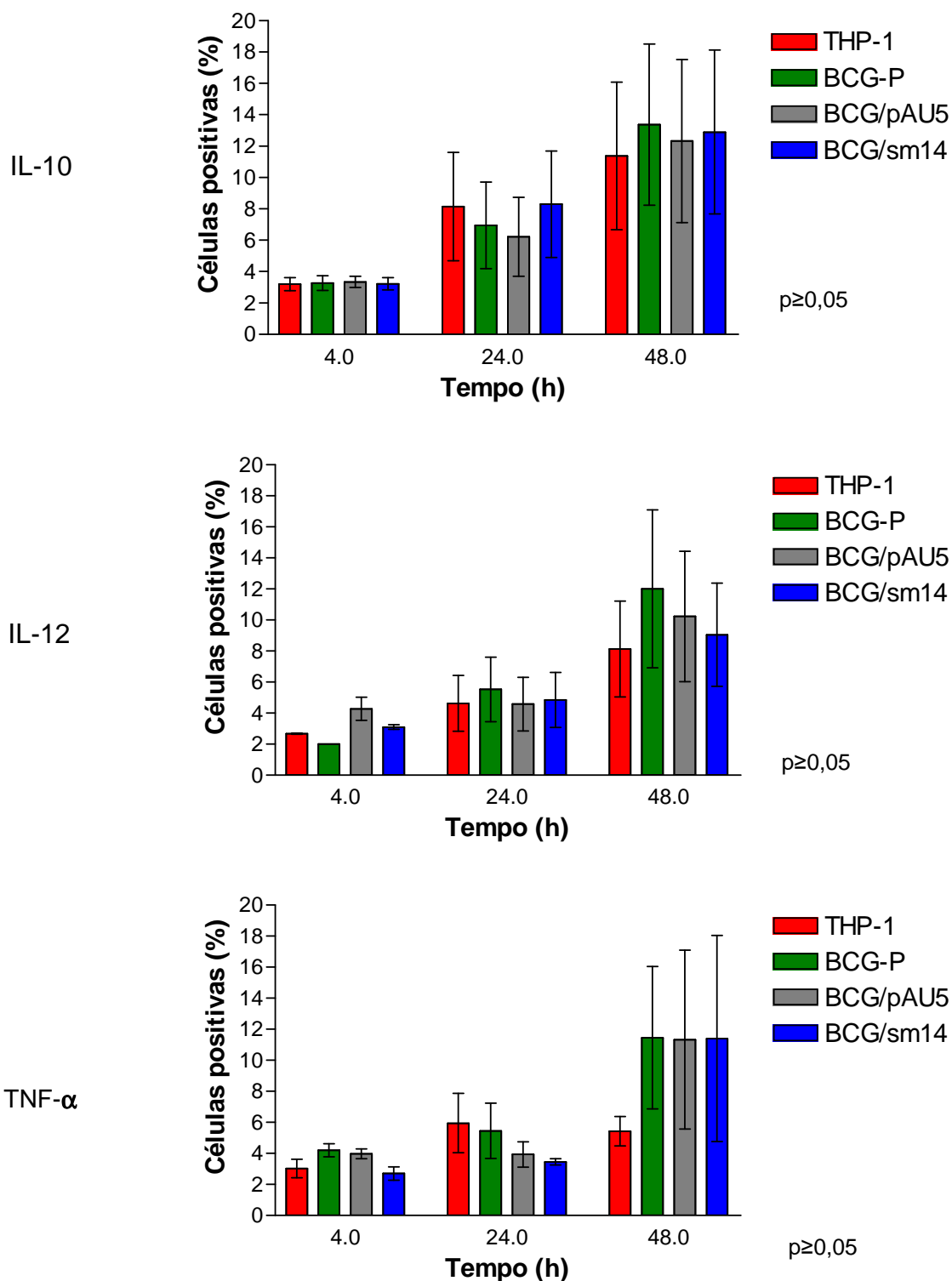


Figura 4.10: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10, IL-12 TNF- α e após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por citometria (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

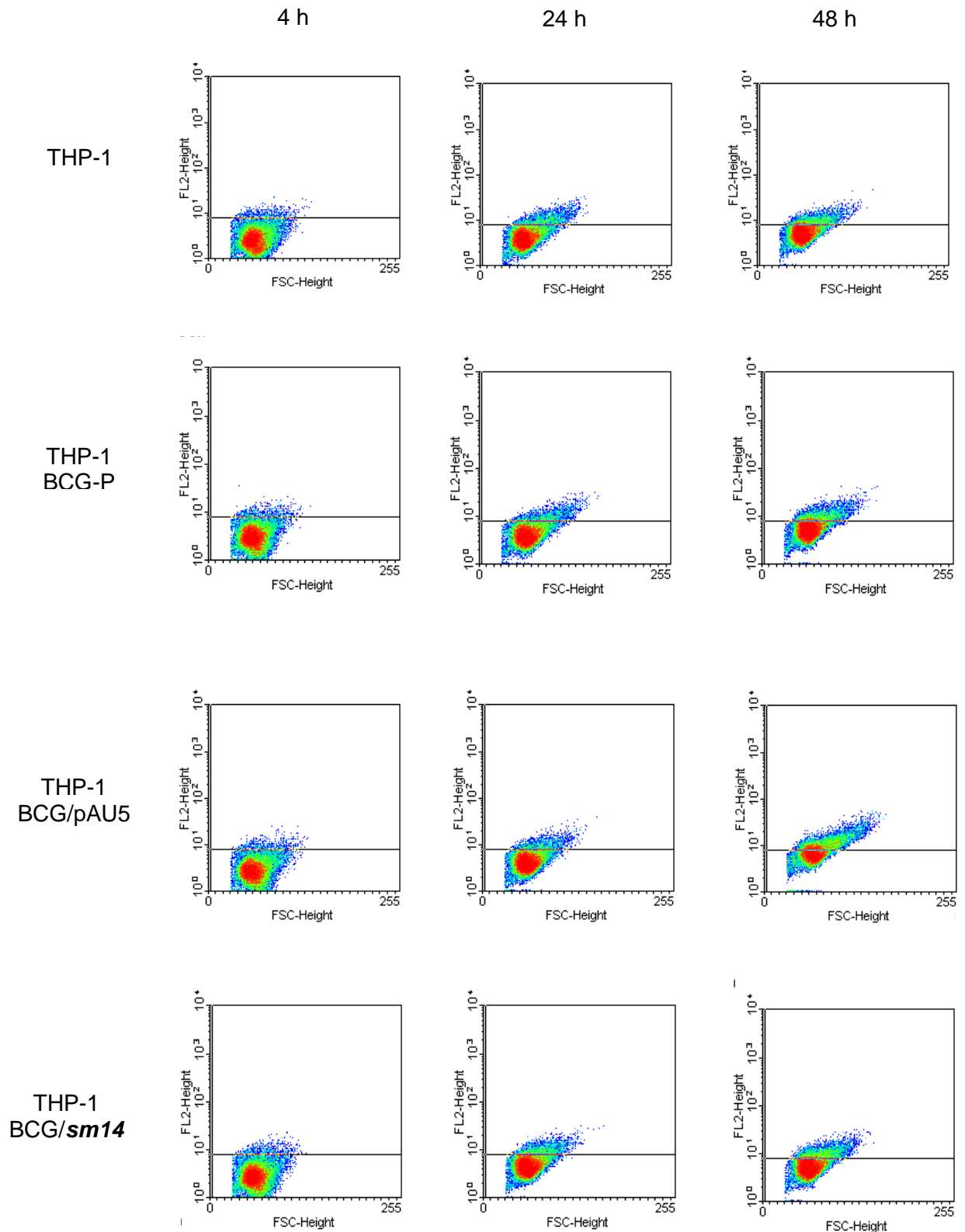


Figura 4.11: Gráfico tamanho (FSC) *versus* fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por citometria (Experimento III).

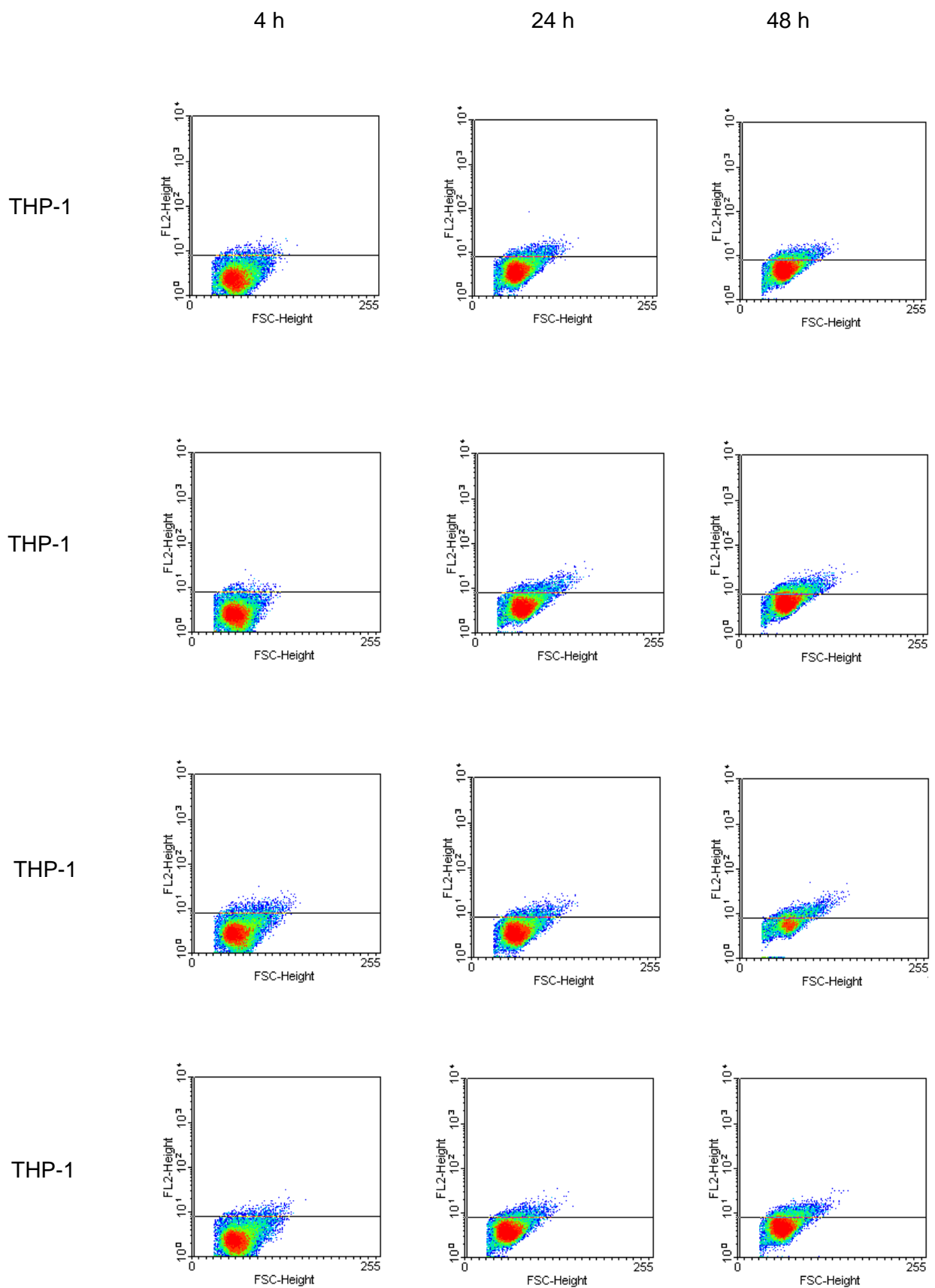


Figura 4.12: Gráfico tamanho (FSC) versus fluorescência (FL1 ou FL2) para a avaliação de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/sm14 e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por citometria (Experimento III).

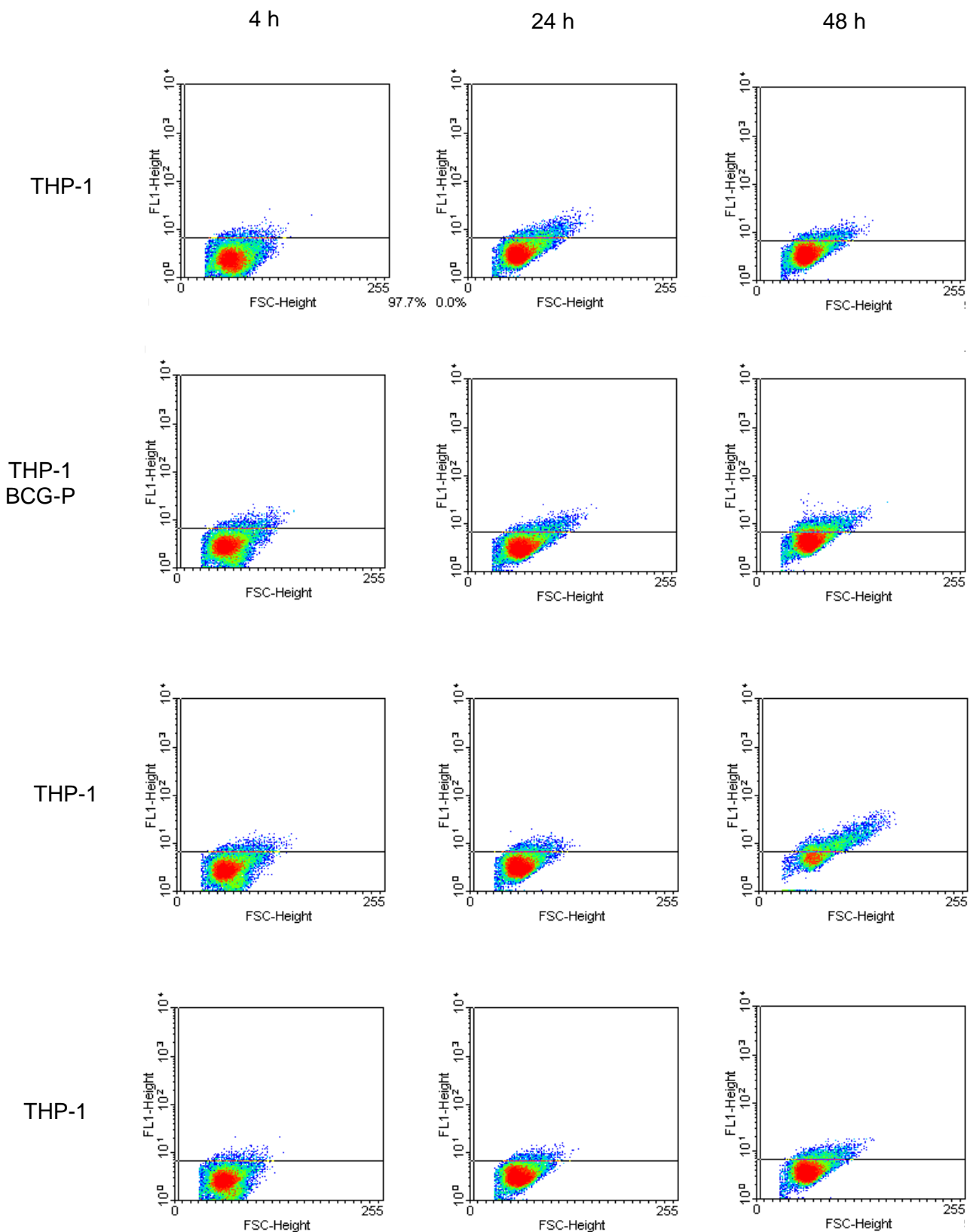


Figura 4.13: Gráfico tamanho (FSC) *versus* fluorescência (FL1 ou FL2) da avaliação de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por citometria (Experimento III).

4.9 Comparação entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo

As células THP-1 infectadas ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles foram avaliadas quanto à produção das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α durante os períodos de 4, 24 e 48 horas, pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo.

4.9.1 Detecção de IL-10

A detecção de células THP-1 produtoras de IL-10 a partir da infecção ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), estão apresentadas na figura 4.13. Nas células THP-1 não infectadas, observa-se uma variação entre 1,8% e 2,6% de células positivas na avaliação pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo nos tempos de 4 horas (5,0% e 3,2%, respectivamente) e 24 horas (8,1% e 10,7%, respectivamente), ocorrendo uma inversão na variação do número de células produtoras de IL-10, no período de 48 horas (6,4% e 11,4%, respectivamente).

Na infecção com BCG-P em células THP-1 revela-se que no período de 4 horas há variação do número de células positivas detectadas pelas duas técnicas (5,9% imunocitoquímica e 2,0% citometria). Já nos períodos de 24 e 48 horas evidencia-se uma variação de 1,0% (5,5% e 6,5%, respectivamente), sendo observado de forma similar às células THP-1 uma inversão entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (5,5% e 12,0%, respectivamente).

Na infecção com BCG/pAU5 em células THP-1 avista-se uma variação de 4,0% do número de células positivas (7,3% e 3,3%, respectivamente) em 4 horas de infecção. No tempo de 24 horas, mantém-se a variação (9,9% e 6,2% respectivamente). No entanto, no tempo de 48 horas de infecção, a porcentagem de células expressando IL-10 detectada pela técnica de imunocitoquímica diminui para 2,9% enquanto pela técnica de citometria de fluxo, aumenta praticamente quatro vezes em relação à porcentagem observada no tempo de 24 horas (12,3%).

Na infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, nos tempos de 4, 24 e 48 horas, avalia-se inicialmente uma variação de 2,1% na detecção de IL-10 pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (5,3% e 3,2%, respectivamente) no tempo de 4 horas. No tempo de 24 horas visualizamos uma pequena queda na variação dos valores obtidos entre as técnicas de imunocitoquímica e citometria

(9,3% e 7,9% respectivamente). observa-se uma inversão do número de células positivas no tempo de 48 horas (6,2% e 12,9% respectivamente).

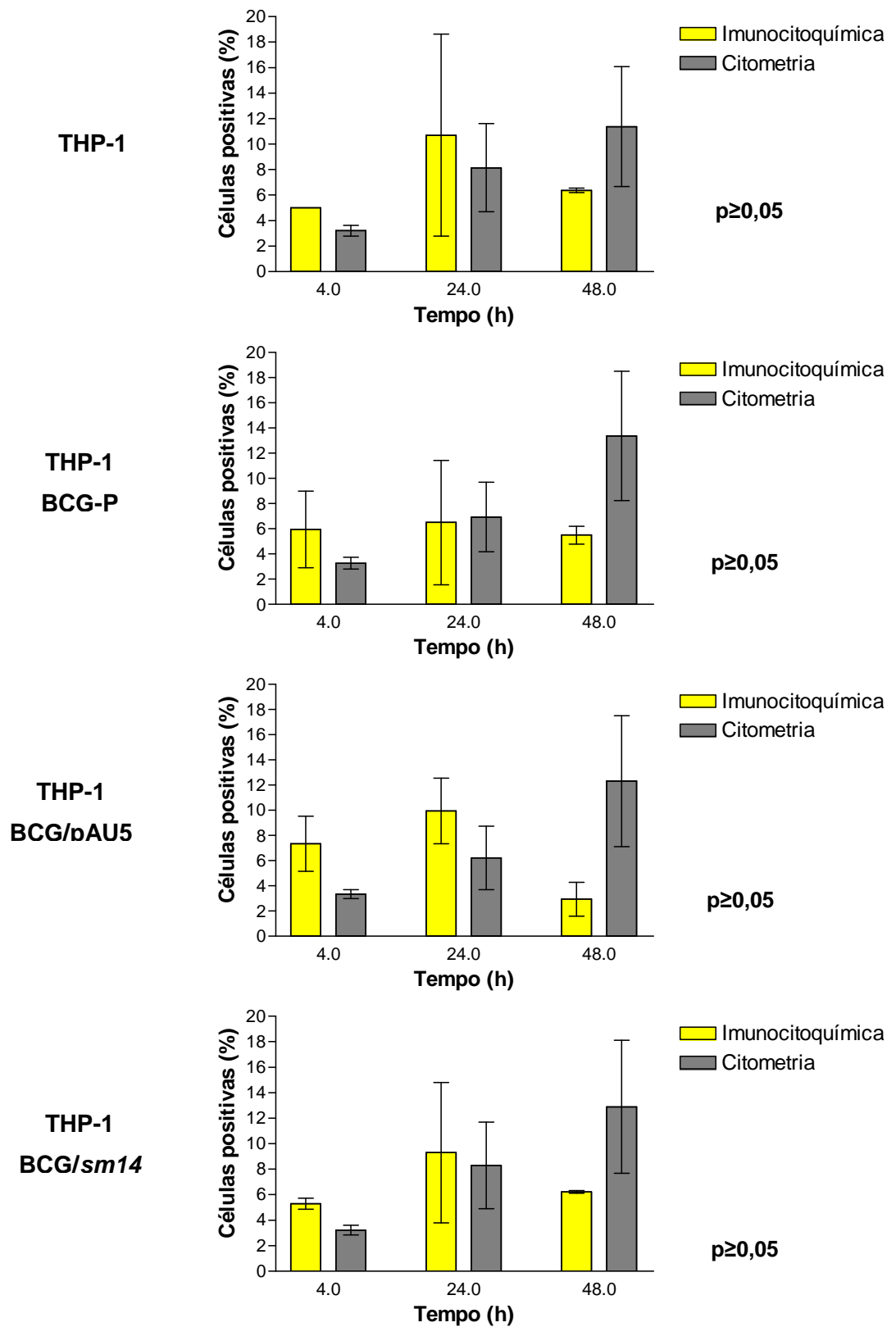


Figura 4.14: Percentagem de células THP-1 expressando IL-10 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por imunocytoquímica e citometria de fluxo (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

4.9.2 Detecção de IL-12

A detecção de células THP-1 produtoras de IL-12 a partir da infecção ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), estão apresentadas na figura 4.14. Nas células THP-1 não infectadas, observa-se uma variação na detecção de células positivas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (8,8% e 2,7%, respectivamente). No período de 24 horas, mantém-se praticamente inalterado o número de células produtoras de IL-12 avaliado pela técnica de imunocitoquímica (8,2%) e um aumento na porcentagem de células positivas avaliados pela técnica de citometria de fluxo (4,6%). No tempo de 48 horas as porcentagens de células THP-1 positivas foram de 3,4% e 8,1% nas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

Na infecção com BCG em células THP-1 revela-se que no período de 4 horas, os valores obtidos foram de 9,4% e 2,0% de células positivas identificadas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria, respectivamente. No período de 24 horas evidencia-se um decréscimo de 4,8% de células avaliadas pela técnica de imunocitoquímica (4,6%) e um aumento de 3,5% de células avaliadas pela técnica de citometria de fluxo. A mesma tendência de inversão na variação dos valores obtidos pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria no tempo de 48 horas após infecção é evidenciado (6,1% e 12,0%, respectivamente).

Na infecção com BCG/pAU5 em células THP-1 avista-se uma variação do número de células positivas detectadas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria no tempo de 4 horas (9,9% e 4,3%). Após 24 horas de infecção, ocorre uma diminuição de 1,6% do número de células positivas determinadas pela técnica de imunocitoquímica e aumento de 0,3% de células positivas avaliadas pela técnica de citometria. Já no tempo de 48 horas de infecção, a porcentagem de células expressando IL-12 detectada pela técnica de imunocitoquímica diminuiu para 7,1% e pela técnica de citometria de fluxo a porcentagem de células positivas aumentou para 10,2%.

Na infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, observa-se uma variação de mais de 6,0% na detecção de IL-12 pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo (9,4% e 3,1%, respectivamente) no tempo de 4 horas. No tempo de 24 horas há um aumento de 1,0% no número de células positivas detectadas pela técnica de imunocitoquímica (10,4%) semelhante ao aumento de 1,7% detectado pela técnica de citometria de fluxo (4,8%). Em 48 horas de infecção, foram

detectados 4,3% e 9,0% de células produtoras de IL-10 pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

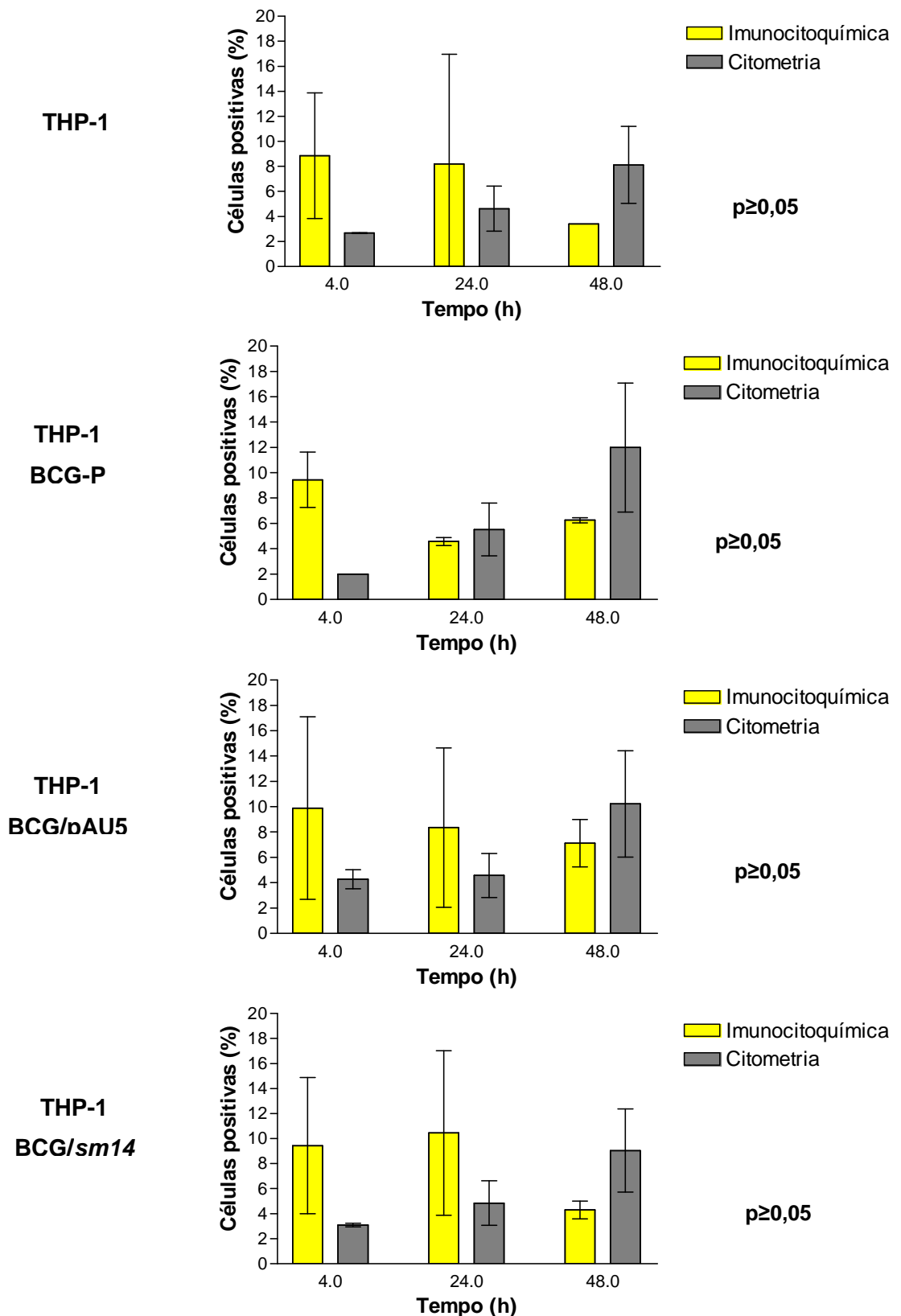


Figura 4.15: Percentagem de células THP-1 expressando IL-12 após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

4.9.3 Detecção de TNF- α

A detecção de células THP-1 produtoras de TNF- α a partir da infecção ou não com o BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), estão apresentadas na figura 4.15. Nas células THP-1 não infectadas, detecta-se no período de 4 horas os valores de 3,6% e 3,0% de células positivas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente. No tempo de 24 horas, ocorre um aumento do número de células produtoras de IL-12 avaliado tanto pela técnica de imunocitoquímica (6,5%) como pela técnica de citometria de fluxo (5,9%). No tempo de 48 horas as porcentagens de células THP-1 positivas foram de 2,2% e 5,4% nas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

Na infecção com BCG em células THP-1 revela-se que no período de 4 horas os valores detectados de células positivas pelas duas técnicas foram de 6,8% pela técnica de imunocitoquímica e 3,0% pela técnica de citometria de fluxo. Já nos períodos de 24 e 48 horas evidenciam-se 6,4% e 5,2%, respectivamente, de células positivas na leitura pela técnica de imunocitoquímica. Nesses mesmos períodos, os valores da leitura pela técnica de citometria de fluxo os valores de células produtoras de TNF- α foram semelhantes (5,9% e 5,4% respectivamente).

Na infecção com BCG/pAU5 em células THP-1 avistam-se os valores de 4,1% e 4,0% de células positivas em 4 horas de infecção pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente. No tempo de 24 horas, há um aumento do número de células expressando TNF- α detectadas pela técnica de imunocitoquímica enquanto pela citometria de fluxo o valor de células positivas mantém-se inalterado (5,5% e 3,9%, respectivamente). Já no tempo de 48 horas de infecção, a porcentagem de células expressando TNF- α detectada pela técnica de imunocitoquímica diminui para 1,5% e na técnica de citometria de fluxo aumenta consideravelmente em relação à porcentagem observada nos tempos de 4 e 24 horas (11,3%).

Na infecção com BCG/*sm14* em células THP-1, nos tempos de 4, 24 e 48 horas, observa-se inicialmente os valores de 4,5% e 3,1% de células produtoras de TNF- α identificadas pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo no tempo de 4 horas de infecção. No tempo de 24 horas há um aumento de células positivas detectadas em ambas as técnicas (7,1% e 4,8% respectivamente). Em 48 horas de infecção, foram detectadas 6,0% e 9,0% de células produtoras de TNF- α pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente.

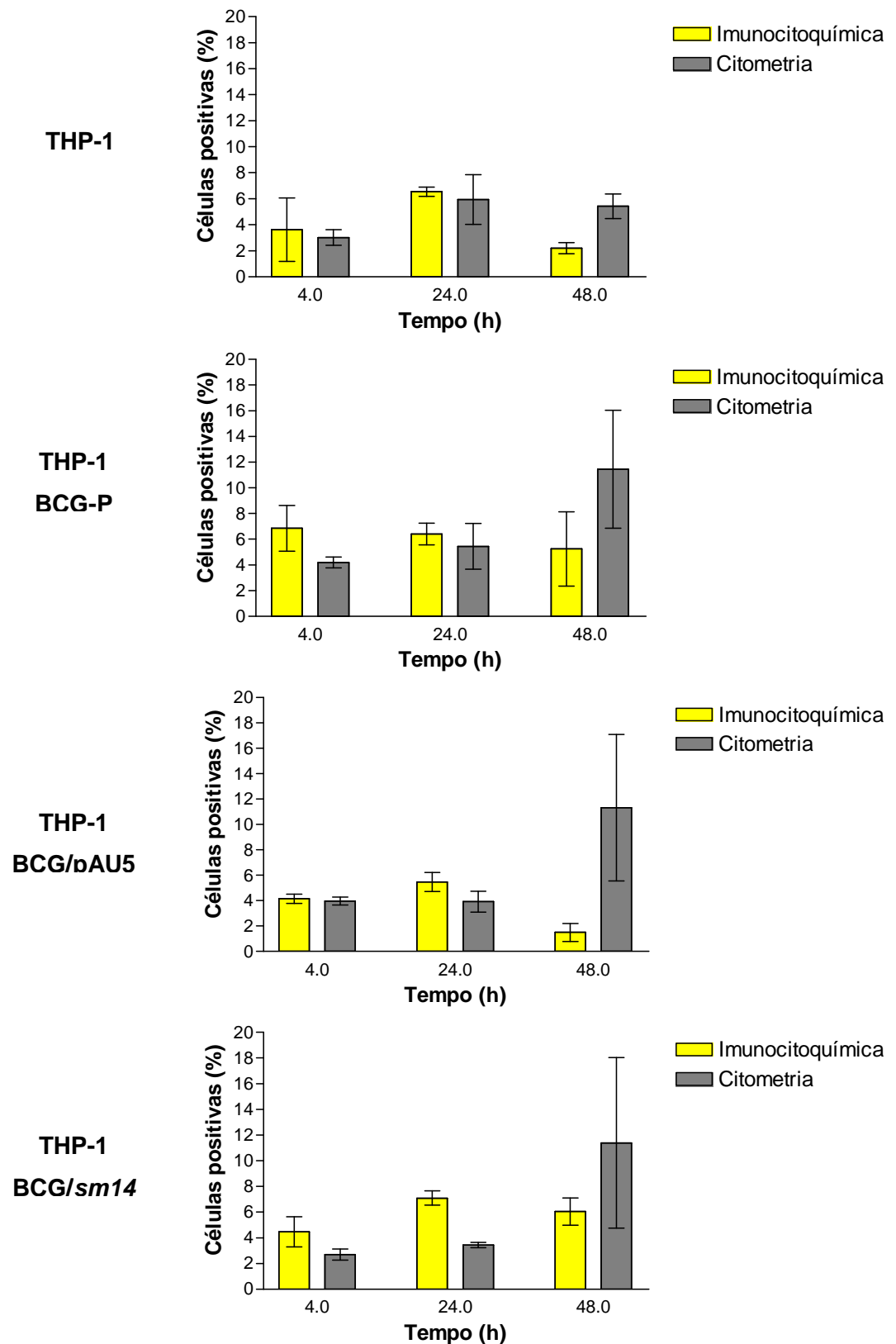


Figura 4.16: Percentagem de células THP-1 expressando TNF- α após a infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14* e os BCGs controles (BCG-P e BCG/pAU5), por imunocitoquímica e citometria (Média de três experimentos). A barra de erro mostra o desvio padrão.

Os resultados obtidos por ambas as técnicas, apesar de divergentes entre si, não permitiram identificar diferenças no perfil de citocinas fabricadas pelas células THP-1 infectadas pelo BCG/*sm14* e pelos BCGs controles.

5. DISCUSSÃO

Devemos considerar alguns pontos importantes para se estudar a resposta imune desencadeada por protótipos vacinais, bem como sua eficácia. Dentre eles, podemos indicar a impossibilidade de se realizar experimentos em seres humanos sem prévios estudos *in vitro* em células humanas e/ou de animais e *in vivo* em animais de experimentação, apesar de sabermos que estes não reproduzem fielmente toda a gama de indução da resposta imune observado no homem (Metz *et al* 2002). Outras questões sobre o uso de animais em experimentação envolvem o benefício potencial contraposto ao sofrimento animal, aspectos legais, morais e éticos. Por estas razões um grande esforço vem sendo realizado na busca de métodos alternativos que sejam capazes de substituir, diminuir ou refinar os métodos de utilização de animais em experimentação, conforme descrito na teoria dos “3 Rs” – *Replacement* (substituição), *Refinement* (refinamento) e *Reduction* (redução) - descrita por Russell e Burch em 1959 (Dellepiane, Griffiths & Milstien 2000, Metz *et al.* 2002, Presgrave 2003).

A grande pressão internacional sobre as indústrias de fármacos, cosméticos e imunobiológicos que são grandes usuárias de animais no desenvolvimento, produção e testes de eficácia e segurança de produtos no sentido de buscarem a validação e aplicação de novas técnicas baseadas nos 3Rs, levou a criação de órgãos como o *Fund for Replacement of Animal Medical Experiments* (FRAME) que, desde 1983, edita uma revista internacional intitulada *Alternatives to Laboratory Animals* (ATLA). Em 1994, foi inaugurado o Centro Europeu para a validação de métodos alternativos (*European Centre for the Validation of Alternative Methods* - ECVAM). Outras instituições, como *Cosmetic, Toiletries and Fragrance Association* (CTFA), *Interagency Regulatory Alternatives Group* (IRAG), *Food and Drug Administration* - EUA (FDA) também atuam nos estudos de relevância e confiabilidade de propostas alternativas, pela pesquisa dos métodos atualmente utilizados e o desenvolvimento e validação de novos testes, para que os produtos químicos e os produtos de várias espécies possam ser manufaturados de forma mais segura e econômica, visando reduzir o uso e minimizar o sofrimento dos animais (Balls 2002, Hendriksen 2005).

Um dos métodos alternativos para substituição ou pelo menos diminuição do uso de animais nas fases de desenvolvimento, produção e testes de algumas vacinas é a adoção de sistemas de ensaios *in vitro*, dentre os quais podemos

destacar o uso de cultura de células (Metz *et al* 2002, Presgrave 2002, Presgrave 2003). A principal vantagem da utilização *in vitro* de cultivos celulares é o controle do ambiente de cultura, podendo-se controlar condições físico-químicas (pH, temperatura, pressão osmótica, níveis de oxigênio (O₂) e CO₂, tensão superficial) e fisiológicas (hormônios, fatores de crescimento, densidade celular), que podem ser mantidas relativamente constantes (Doyle & Griffiths 1998, Freshney 2000a). Outras vantagens relevantes são: a homogeneidade das células em cultivo em relação à morfologia e especificidades uniformes, podendo com facilidade obter um número elevado de réplicas idênticas, superando assim o problema de heterogeneidade de amostras, reduzindo a variação e o custo dos experimentos, possibilitando a realização de múltiplos testes com muitas variáveis (Doyle & Griffiths 1998, Freshney 2000a).

A técnica de cultura de células integrada com sistemas computacionais e a hierarquização de métodos podem ser ferramentas importantes para etapas do desenvolvimento de protótipos vacinais (Figura 5.1), sendo utilizada principalmente para procedimentos de seleção (*screening*) de vacinas candidatas na fase pré-clínica (Henriques & Sampaio 2002, Larsen 2005).

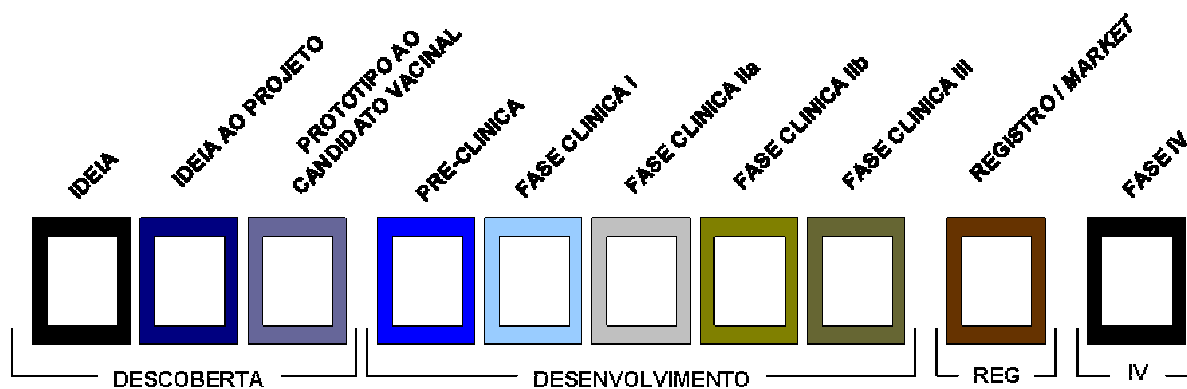


Figura 5.1: Modelo esquemático das etapas necessárias para implantação de novos fármacos e imunobiológicos (Adaptado de Larsen 2005).

Este estudo visou o desenvolvimento de um protocolo para a seleção de protótipos vacinais utilizando como modelo *M. bovis* BCG sub-cepa Pasteur expressando o antígeno Sm14 de *Schistosoma mansoni* e a linhagem de monócitos humanos THP-1 como substrato celular. Contudo, a eficiência da resposta imune induzida por BCGs recombinantes é dependente da capacidade de expressão da proteína heteróloga, uma vez que essa expressão pode interferir na

ativação celular. Assim, confirmamos a expressão da proteína Sm14 por todos os clones do protótipo vacinal BCG/*sm14*, e nossos resultados corroboram com relatos anteriores Argondizzo (2005), utilizando o mesmo sistema de expressão. Desta forma, assumimos que todos os recombinantes BCG/*sm14* estavam expressando a proteína de interesse em quantidade suficiente para o prosseguimento dos experimentos de infecção com os protótipos vacinais em linhagens monocíticas.

Para a realização dos ensaios de infecção de células THP-1 com o BCG/*sm14*, foi necessário determinar a MOI capaz de induzir a melhor dose resposta para a expressão das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α . Assim sendo, foram avaliadas três diferentes relações, 5, 10 e 50 BCGs para cada célula THP-1. Os resultados obtidos mostram que o fato da MOI de 50 BCG:THP-1 não ter estimulado adequadamente a expressão de citocinas, sugere que esta concentração de BCG promove perda da viabilidade de células THP-1 (Hassan *et al* 2006). Por outro lado, a MOI de 10 de BCG/THP-1 estimula uma maior porcentagem de células produtoras de IL-10 e IL-12, tendo sido considerada, portanto a melhor dose-resposta para a síntese das citocinas neste estudo. Entretanto, ao contrário do observado por Oliveira, Charlab & Pessolani (2001), que na análise das MOI de 1, 10 e 100 de BCG e *M. leprae* para cada célula THP-1, concluíram que a relação de 10:1 de micobactérias-célula THP-1 induz uma maior produção de TNF- α , no presente trabalho a MOI de 5 BCGs apresentou o melhor resultado com relação às células produtoras de TNF- α . Atkinson e colaboradores (2000), realizaram de forma semelhante uma pesquisa do perfil de citocinas (IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α) expressas por linhagem primária de macrófagos humanos infectadas com MOI de 0,2, 1 e 5 BCGs, concluindo que a MOI de 5 BCG/célula induz de forma eficiente a expressão das citocinas IL-10 e TNF- α por macrófagos infectados. Devido a divergências entre os resultados obtidos neste trabalho e os resultados relatados na literatura para determinar a relação padrão para avaliação de citocinas a partir da interação BCG-macrófago, e como o maior percentual de células expressando IL-10 e IL-12 foi atingido com a relação de 10 BCG para cada célula THP-1, optamos por usar esta proporção nos ensaios de imunocitoquímica e citometria para a quantificação das células produtoras de citocinas infectadas com o protótipo vacinal BCG/*sm14*.

Dentre os requerimentos para se determinar o sucesso de protótipos vacinais está a indução e ativação das APCs, que irão realizar o processamento de antígenos, a expressão de fatores co-estimulatórios, secreção de citocinas e a

apresentação antigênica às células T, tornando-se essenciais para o desencadeamento da resposta imune (Ada 2004). Neste contexto, utilizamos uma linhagem de monócitos humanos como modelo para infecção, recuperação e análise do perfil de citocinas (IL-10, IL-12 e TNF- α) expressas em células THP-1 após infecção com o protótipo vacinal BCG/*sm14*. Vários autores têm utilizado esta linhagem celular como modelo de averiguação do perfil de ativação celular em monócitos (Diaz-Silvestre *et al.* 2005, Xia *et al.* 2005, Ciabattini *et al.* 2006) ou células maduras – macrófagos (Oliveira, Charlab & Pessolani 2001, Lewis *et al.* 2003, Theus, Cave & Eisenach 2004, Theus, Cave & Eisenach 2005, Hasan *et al.* 2006).

Da mesma forma, autores como Takahashi (2003), Ada (2004) e Plotkin (2005a), destacam que o reconhecimento e a ativação das APCs podem ser considerados como etapas relevantes para avaliação de protótipos vacinais e para o sucesso vacinal. Os monócitos são importantes células efetoras capazes de responder rapidamente a estímulos imunes de diferentes formas, como produção de proteínas inflamatórias, expressão de moléculas de adesão em sua superfície, ativação e diferenciação em macrófagos. Neste contexto, utilizamos a cintilografia para o acompanhamento da proliferação da célula THP-1 infectada ou não com o protótipo vacinal BCG/*sm14*, com a amostra vacinal de BCG Pasteur e com a construção BCG/pAU5. A medição de partículas beta emitidas pela timidina-H³ captada pelas células THP-1, nos permite determinar a capacidade do protótipo vacinal de ativar as células THP-1 e modificar seu estado de célula jovem, indiferenciada (monócitos) e transformá-las em células ativadas (macrófagos), a partir da redução de sua capacidade de replicação (Bennett *et al.* 1993). Nas condições avaliadas, nossos resultados mostram que as amostras de BCGs utilizadas para infectar as células THP-1 foram capazes de estimular esta linhagem, não sendo evidenciada diferenças no perfil de ativação induzido pela amostra vacinal de BCG, o protótipo vacinal BCG/*sm14* e a construção BCG/pAU5. Como a ativação dos monócitos/macrófagos não é específica, não podemos determinar o “quanto” a proteína Sm14 foi responsável pela diferenciação celular. Experimentos futuros devem ser desenhados para determinar neste sistema a capacidade de ativação da proteína Sm14.

Além da avaliação da proliferação de células THP-1, autores como Medeiros (2001), Varaldo e colaboradores (2004) e Argondizzo (2005), assinalaram a necessidade de avaliarmos a capacidade de infecção e a manutenção do

crescimento intracelular de protótipos vacinais baseados na tecnologia do BCG recombinante em culturas de monócito/macrófago. Com esse objetivo, montamos um experimento para acompanhar a cinética de crescimento do BCG/*sm14*, em paralelo com os BCGs controles (BCG e BCG/pAU5) empregados na infecção e na recuperação em células THP-1, nos tempos de 4, 24 e 48 horas. Nossos dados assemelham-se com os descritos na literatura (Medeiros 2001, Varaldo *et al.* 2004, Argondizzo 2005), não detectando diferenças significativas na capacidade de infecção e de crescimento intracelular entre as amostras de BCG testadas, sendo visualizada uma pequena redução do número de UFC recuperadas entre o período basal de 4 horas e após 24 e 48 horas. Podemos concluir que nas condições estudadas o protótipo vacinal BCG/*sm14* possui a mesma aptidão de infecção e persistência intracelular da amostra vacinal BCG Pasteur e da construção BCG/pAU5, favorecendo seu uso como protótipo vacinal.

Devido à problemática da estabilidade de plasmídeos recombinantes, a qual interfere fundamentalmente com a expressão da proteína heteróloga por vacinas recombinantes baseadas em vetores vivos atenuados e, evidentemente, na plataforma do BCG recombinante (Haeseleer 1994), realizou-se a avaliação da estabilidade funcional do BCG transformado com o plasmídeo pAU5-*sm14* (BCG/*sm14*). A capacidade dos BCGs recombinantes (BCG/*sm14* e BCG/pAU5) de manterem o fenótipo de resistência para canamicina (Kan), mostra que não há diferença expressiva entre os BCGs recombinantes cultivados nos meios seletivo (7H11+Kan) e não seletivo (7H11). Esses resultados confirmam os dados obtidos no trabalho realizado por Argondizzo (2005) e são extremamente importantes para o desenvolvimento de vacinas baseada na utilização do BCG como vetor vivo atenuado de imunógenos, porque demonstram que BCGs recombinantes permanecem estáveis e expressando continuamente o gene inserido mesmo no ambiente intracelular de macrófagos (Medeiros 2001, Argondizzo 2005).

Recentemente Chabalgoity e colaboradores (2007) descrevem a importância da indução de citocinas para o desenvolvimento de uma resposta protetora para o desenho de vacinas. Visando obter dados preliminares que permitam demonstrar a viabilidade da seleção *in vitro* de vacinas, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar a possibilidade de se determinar o perfil de citocinas induzidas por protótipos vacinais em linhagem de células humanas.

As citocinas são consistentemente avaliadas e quantificadas durante testes pré-clínicos e clínicos, como marcadores de ativação e/ou supressão da resposta

imune induzida pelos protótipos vacinais. Nessa conjuntura, foi realizada a análise das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α expressas pela infecção com protótipo vacinal BCG/*sm14*, com a amostra vacinal de BCG Pasteur e com a construção BCG/pAU5 em células THP-1. Para a detecção intracelular de citocinas em células, utilizamos a técnica de imunocitoquímica (Santiago 2003) e a técnica de citometria (Kallás 1999).

A produção de citocinas induzidas pelo BCG em células mononucleares periféricas humanas segue uma cinética (Sander *et al.* 1995) que varia de indivíduo para indivíduo e tende a ser mediada por um perfil Th1 nos primeiros 5 a 7 dias, regredindo e assumindo perfil Th2 posteriormente (9 a 12 dias após a infecção). Contudo, estes autores não diferenciaram a produção de IL-10 pelos monócitos/macrófagos e linfócitos T. Mas a detecção de IL-10 foi identificada somente após 10 dias de infecção, o que contradiz nossos resultados e os de Atkinson e colaboradores (2000). Uma possível explicação pode estar na metodologia utilizada, na utilização de células não estimuladas e na obtenção destas células de indivíduos não expostos a micobactérias ou não vacinados pelo BCG. Sander e colaboradores (1995) utilizaram a técnica de imunofluorescência indireta e observação microscópica, enquanto Atkinson e colaboradores (2000) utilizaram macrófagos derivados de monócitos humanos. Em nosso sistema, a secreção de IL-10 é evidenciada em células THP-1 sem prévia ativação após 4 horas de incubação, da mesma forma após 24 horas observamos resultados similares aos descritos por Atkinson e colaboradores (2000) em macrófagos derivados de monócitos (*Monocyte-derived macrophage* – MDM). De modo interessante estes autores evidenciaram uma grande variabilidade na secreção de citocinas por MDM humanos, neste caso variando de 1,0 a 7,0% de células positivas para IL-10 após 20 horas de infecção. Observamos uma diferença entre nossos resultados obtidos pelas duas técnicas (imunocitoquímica e citometria), variando de 6,4% a 11,4%, respectivamente.

Quanto a secreção de IL-12 evidenciamos que as células THP-1 produzem, mesmo sem estímulos valores entre 2,7% e 8,8%, contudo Ciabattini e colaboradores (2006) descrevem a expressão de níveis basais de IL-12 em células mononucleares humanas (Ciabattini *et al.* 2006; 1 a 3%). O perfil de expressão de IL-12 expresso pelas células THP-1 não pode ser claramente identificado pela discrepância entre as duas metodologias utilizadas por nós, ou seja, a técnica de imunocitoquímica mostrou que 8,8% das células expressavam IL-12, enquanto que por citometria identificamos 2,7% de células positivas. Contudo após infecção pelo BCG foi observado um percentual que variou de 4,6% a 6,5% após 24 horas e 6,1 a

12,0% após 48 horas, indicando um aumento progressivo de células produtoras de IL-12. A infecção pelo BCG/sm14 também foi capaz de induzir percentuais semelhantes de células produtoras de IL-12.

Independente da metodologia utilizada, as infecções por BCG e BCG/sm14 induziram um percentual ligeiramente maior de células expressando IL-10 do que IL-12. Este perfil parece ser característico das células THP-1, e a infecção com BCG/sm14 não foi capaz de modificar esse perfil.

Uma análise mais longa, estudando a associação entre o BCG e as células THP-1 pode responder se a indução tardia destas citocinas pode ser modificada, visto não termos evidenciado esta mudança em culturas de até dois dias de interação.

Uma das maiores dificuldades para o desenvolvimento de uma vacina contra esquistossomose está a complexidade da interação entre patógeno e hospedeiro. As cercárias, os vermes adultos e os diferentes estágios de desenvolvimento entre estas formas apresentam mecanismos que permitem a estes evadir de uma resposta imune efetiva, incluindo a produção de moléculas antiinflamatórias, a inibição da migração de células apresentadoras de antígeno e a cobertura da superfície do parasito com moléculas do hospedeiro (Lebens *et al.* 2004). Outro ponto importante é o pouco entendimento da natureza da resposta imune protetora (Wynn & Hoffmann 2000, Pearce & McDonald 2002, Lebens *et al.* 2004).

Alguns autores demonstraram que em modelo murino e humano, a resposta Th2 seria eficaz para o controle da doença, ao passo que estudos de vacinação em camundongos indicam que uma imunidade mediada por células T, envolvendo a produção de IFN- γ e IL-12 (Th1), poderia ser melhor (Capron *et al.* 1995, Wynn & Hoffmann 2000). No entanto, a questão da resposta imune efetiva contra esquistossomose ainda é bastante polêmica. Existem autores que acreditam ser a resposta imune humoral a mais eficaz para a proteção de humanos e outros defendem a resposta imune celular, mas existem, também, aqueles que acreditam que ambas as respostas humoral e celular são imprescindíveis para a proteção (Brito *et al.* 2000, Ribeiro de Jesus *et al.* 2000, Varaldo *et al.* 2004). Estudos imunológicos em pessoas residentes em zonas endêmicas para esquistossomose, demonstraram altos níveis de IgE e IFN- γ , sugerindo a participação das respostas celular e humoral nos mecanismos imunológicos de resistência natural a reinfeção de *S. mansoni* (Ribeiro de Jesus *et al.* 2000). O estudo realizado por Brito e colaboradores (2000) na avaliação das respostas imunes frente à proteína Sm14 em

grupos de pessoas residentes em zonas endêmicas de esquistossomose e de pacientes crônicos e tratados para a doença, em relação à avaliação das citocinas produzidas, os níveis de IL-5 e IL-10, conhecidas como citocinas Th2, não foram estatisticamente diferentes em nenhum dos grupos estudados. Já o IFN- γ e TNF- α foram produzidos em quantidades significativamente maiores pelas PBMC de indivíduos normais endêmicos. Adicionalmente demonstraram que a IL-10 é uma importante citocina moduladora de respostas de células T na esquistossomose crônica, enquanto que a proliferação de linfócitos no grupo resistente não infectado é dependente de IFN- γ . Estes resultados sugerem que a resposta imune do tipo Th1 induzida em indivíduos normais endêmicos para um antígeno de esquistossomo poderia estar associada com resistência à infecção e também destacou a importância da Sm14 como potencial candidato vacinal contra esquistossomose humana (Brito *et al.* 2000).

Uma possível justificativa para nossos resultados seria o fato da proteína Sm14 ser expressa no citoplasma do BCG aliado a persistência intracelular BCG/*sm14* em células THP-1, não estando assim, disponível para a estimulação dos macrófagos. Nesse caso a apresentação do antígeno de interesse (Sm14) só acontece quando a Sm14 é liberada do fagossomo após a destruição do BCG (Kaufmann & Hess 1999). Dados obtidos por Varaldo e colaboradores (2004) e Argondizzo (2005), demonstram que não foram detectados anticorpos anti-Sm14 em camundongos imunizados com cepas recombinantes de BCG/*sm14*. Todavia vários autores já demonstraram, não somente a expressão de diversos antígenos no citoplasma de BCG recombinantes, como também conseguiram induzir uma eficiente resposta imune humoral, independente do sistema de apresentação no qual o antígeno alvo estava sendo expresso (Aldovini & Young 1991, Murray *et al.* 1992, Stover *et al.* 1991, Kremer *et al.* 1998, Hayward *et al.* 1999; da Cruz *et al.* 2002).

Os resultados obtidos não foram capazes de diferenciar o protótipo vacinal BCG/*sm14*, da amostra vacinal BCG Pasteur e da construção BCG/pAU5, não servindo, portanto, como comparativo aos trabalhos descritos para a determinação do perfil de citocinas obtidas nas respostas imunes contra o BCG e contra a proteína Sm14.

6. CONCLUSÕES

- Desenvolveu-se um protocolo de infecção com BCGs em células THP-1, determinando que a melhor relação foi de 10 BCGs para cada célula THP-1.
- A expressão da proteína recombinante Sm14 sintetizada pelos clones de BCG/*sm14* demonstrou-se satisfatória para realização dos experimentos de infecção em células THP-1
- O protótipo vacinal BCG/*sm14* manteve o mesmo grau de infecciosidade e persistência intracelular da sub-cepa vacinal BCG Pasteur.
- O protótipo vacinal BCG/*sm14* manteve a mesma capacidade de induzir a diferenciação e a maturação de macrófagos provenientes da linhagem de monócitos THP-1 que a sub-cepa vacinal BCG Pasteur.
- O protótipo vacinal BCG/*sm14* não foi capaz de modificar o perfil de IL-10, IL-12 e TNF- α induzido pela sub-cepa vacinal BCG Pasteur em células THP-1

7. PERSPECTIVAS

- Como a indução da resposta imune ao *Schistosoma mansoni* é preferencialmente induzida por resposta Th2 (aumento de IL-10 e diminuição de IL-12, IFN- γ e IL-2), a utilização do recombinante BCG/*sm14* como protótipo vacinal pode ser de relevância para a indução de resposta protetora para a esquistossomose, como para a tuberculose, visto que não houve diferença marcante na produção de IL-10 e/ou IL-12.
- Novos experimentos devem ser realizados para determinar o papel das células apresentadoras de antígenos na modulação de células T CD4 e CD8 visando um melhor entendimento da resposta imune adaptativa e de memória.
- A modulação das células apresentadoras de antígenos (monócitos, macrófagos, células dendríticas) pode direcionar a resposta imune a protótipos vacinais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK & Lichtman AH. **Imunologia celular e molecular**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005a. Cap.11: Citocinas. p. 251–282.

_____. **Imunologia celular e molecular**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005b. Cap.12: Imunidade inata. p. 283–306.

Ada G. The immunology of vaccination. In: Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines**. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2004. p. 31–46

_____. **Vaccines and vaccination**. N Engl J Med. 2001; 345 (14): 1042–1053

Al-Sherbiny M, Osman A, Barakat R, El Morshedy H, Bergquist R, Olds R. **In vitro cellular and humoral responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens**. Acta Trop. 2003; 88 (2): 117-130.

Aldovini A & Young RA. **Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-mv vaccines**. Nature. 1991; 351: 479–482

Amadori M, Ritelli M, Tagliabue S, Pacciarini ML. **Macrophage cell cultures for rapid isolation of intracellular bacteria: the *Mycobacterium bovis* model**. Methods Mol Biol. 2006; 345: 203–217

André FE. **Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises**. Vaccine 2003; 21: 593–595.

Argondizzo APC. **Construção do *M. bovis* BGC recombinante Sm14r e Avaliação da sua Capacidade Protetora contra Esquistossomose no Modelo Murino**. Rio de Janeiro; 2005. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] – FIOCRUZ

ATCC – *American type culture collection* **THP-1 Catalog Details: TIB-202** [online]. Manassas, EUA. 2006. [capturado em 10 de setembro de 2006]. Disponível em: <http://www.atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=TIB-202>

Atkinson S, Valadas E, Smith SM, Lukey PT, Dockrell HM. **Monocyte-derived macrophage cytokine responses induced by *M. bovis* BCG**. Tuber Lung Dis. 2000; 80 (4-5):197-207. Erratum in: Tuber Lung Dis 2000; 80 (6): 293.

Auwerx J. **The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation**. Experimentia. 1991; 47: 22–31.

Balls M. **Future Improvements: replacement *in vitro* methods**. ILAR J. 2002; 43 (Suppl): S69–S73

Bastos K.RB, Alvarez JM, Marinho CRF, Rizzo LV, D'Império Lima MR. **Macrophages from IL-12p40-deficient mice have a bias toward the M2 activation profile**. J. Leukoc. Biol. 2002; 71: 271–278

Bennett S, Por SB, Cooley MA, Breit SN. ***In vitro* replication dynamics of human culture-derived macrophages in a long term serum-free system**. J Immunol. 1993; 150 (6): 2364–2371

Berges C, Naujokat C, Tinapp S, Wieczorek H, Hoh A, Sadeghi M, Opelz G, Daniel V. **A cell line model for the differentiation of human dendritic cells.** Biochem Biophys Res Commun. 2005; 333 (3): 896–907

Beverley PCL. **Immunology of vaccination.** Br Med Bull. 2002; 62: 15-28

Bonah C. **The 'experimental stable' of the BCG vaccine: safety, efficacy, proof, and standards, 1921-1933.** Stud Hist Philos Biol Biomed Sci. 2005; 36(4): 696–721

Brito CF, Caldas IR, Coura Filho P, Correa-Oliveira R, Oliveira SC. **CD4+ T cells of schistosomiasis naturally resistant individuals living in an endemic area produce interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha in response to the recombinant 14KDA *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein.** Scand J Immunol. 2000; 51 (6): 595–601

Brusic V, August JT & Petrovsky N. **Information technologies for vaccine research.** Expert Rev Vaccines. 2005; 4 (3): 407–417

Campbell D, Mann BJ & Chadee K. **A subunit vaccine candidate region of the *Entamoeba histolytica* galactose-adherence lectin promotes interleukin-12 gene transcription and protein production in human macrophages.** Eur J Immunol. 2000; 30 (2): 423-30.

Capron A, Riveau G, Grzych JM, Boulanger D, Capron M, Pierce R. **Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomes: background and update.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 1995; 90 (2): 235–240

Carrel A. **On the permanent life of tissues outside the organism.** J. Exp. Med. 1912, 15: 516 – 528 *apud* Freshney RI. Introduction to basic principles. In: Masters JRW. **Animal cell culture: a practical approach.** 3rd ed. Oxford: Oxford University Press. 2000b: 1-18.

Chabalgoity JA, Baz A, Rial A, Grille S. **The relevance of cytokines for development of protective immunity and rational design of vaccines.** Cytokine Growth Factor Rev. 2007; 18 (1-2): 195–207

Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. **The global status of schistosomiasis and its control.** Acta Trop. 2000; 77 (1): 41–51

Ciabattini A, Cuppone AM, Pulimeno R, Iannelli F, Pozzi G, Medaglini D. **Stimulation of human monocytes with the gram-positive vaccine vector *Streptococcus gordonii*.** Clin Vaccine Immunol. 2006; 13 (9): 1037-43.

Clingan JM, Yanagawa Y, Iwabuchi K, Onoé K. **Effect of T helper 1 (Th1) / Th2 cytokine on chemokine-induced dendritic cell functions.** Cell Immunol. 2006; 242: 72–79.

Costa-Carvalho BT & Sole D. Bases Imunológicas. In: Farhat CK, Carvalho ES, Weckx LY, Carvalho LHFR, Succi RCM, org. **Imunizações: fundamentos e prática** 4^a ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2000. p. 19–36.

da Cruz FW, McBride AJA, Conceição FR, Dale JW, McFadden J, Dellagostin OA. **Expression of the B-cell and T-cell epitopes of the rabies virus nucleoprotein in *Mycobacterium bovis* BCG and induction of an humoral response in mice.** *Vaccine*. 2002; 20: 731–736

Dai W, Gao H, Huang H, Yuan Y, Hu J, Huangfu Y. **Comparative study on the immunogenicity between recombinant MS-Sj26GST vaccine and recombinant BCG-Sj26GST vaccine in *Schistosoma japonicum*.** *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2003, 23 (3): 213–5

Dellepiane N, Griffiths E & Milstien JB. **New challenges in assuring vaccine quality.** *Bull World Health Organ*. 2000; 78 (2): 155–62

Di Marzo P, Puddu P, Conti L, Belardelli F, Gesani S. **Interferon- γ up-regulates its own gene expression in mouse peritoneal macrophages.** *J Exp Med*. 1994; 179: 1731-1736.

Diaz-Silvestre H, Espinosa-Cueto P, Sanchez-Gonzalez A, Esparza-Ceron MA, Pereira-Suarez AL, Bernal-Fernandez G, Espitia C, Mancilla R. **The 19-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a major adhesin that binds the mannose receptor of THP-1 monocytic cells and promotes phagocytosis of mycobacteria.** *Microb Pathog*. 2005; 39 (3): 97–107

Doyle A & Griffiths JB. **Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology.** West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 1998. Cap.1 The cell: Selection and standardization. p. 3–52

Ellis RW. Technologies for making new vaccines. **In:** Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines.** 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2004. p. 1177–1198

Esser MT, Marchese RD, Kierstead LS, Tussey LG, Wang F, Chirmule N, Washabaugh MW. **Memory T cells and vaccines.** *Vaccine*. 2003, 21 (5-6): 419–430

Fantuzzi L, Puddu P, Varano B, Del Corno M, Belardelli F, Gessani S. **IFN-alpha and IL-18 exert opposite regulatory effects on the IL-12 receptor expression and IL-12-induced IFN-gamma production in mouse macrophages: novel pathways in the regulation of the inflammatory response of macrophages.** *J Leukoc Biol*. 2000; 68: 707-714.

FDA – *Food and drug administration.*. **Guidance for industry: Characterization and qualification of cell substrates and other biological starting materials used in the production of viral vaccines for the prevention and treatment of infectious disease.** [online]. Rockville: 2006. [capturado em 10 de janeiro de 2007]. Disponível em: <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>.

Fernandes ATG. **Identificação de células citotóxicas presentes no processo inflamatório uterino durante a co-infecção pelo vírus da imunodeficiência humana HIV e pelo vírus do papiloma humano HPV.** Rio de Janeiro. 2003. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] Fiocruz.

Freshney RI. Introduction to basic principles. In: Masters JRW, org. **Animal cell culture: a practical approach**. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press. 2000a. p. 1–18

_____. **Culture of animal cells: a manual of basic techniques**. 4th ed. New York: Wiley-Liss Inc. 2000b. Cap.1: Introduction. p. 1–8

Guermontez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. **Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells**. Annu Rev Immunol. 2002; 20: 621-67.

Haeseleer F. **Structural instability of recombinant plasmids in mycobacteria**. Res Microbiol. 1994; 145: 683–687

Harrison RG. **Observations on the living developing nerve fiber**. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1910, 140: 1905 – 7 *apud* Freshney RI. Introduction to basic principles. In: Masters JRW, org. **Animal cell culture: a practical approach**. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press. 2000b. p. 1-18.

Hasan Z, Ashraf M, Tayyebi A, Hussain R. **M. leprae inhibits apoptosis in THP-1 cells by downregulation of Bad and Bak and upregulation of Mcl-1 gene expression**. BMC Microbiol. 2006; 6: 1-9.

Hayward CMM, O'Gaora P, Young DB, Griffin GE, Thole J, Hirst TR, Castello-Branco LR, Lewis DJM. **Construction and murine immunogenicity of recombinant Bacille Calmette Guérin vaccines expressing the B subunit of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin**. Vaccine. 1999, 17: 1272–1281.

Hendriksen CFM. **Laboratory animals and immunization procedures: challenges and opportunities**. ILIAR J. 2005; 46 (3): 227–229.

Henriques MGMO & Sampaio ALF. Alternativas para animais de laboratório: sistemas *in vitro*. In: Andrade A, Pinto SC & Oliveira RS, org. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002: 337–344

Kallás EG. **Detecção da produção antígeno-específica de IFN γ e IL-4 por linfócitos T de sangue periférico após infecção e vacinação**. São Paulo 1999. Doutorado [Escola Paulista de Medicina] Universidade Federal de São Paulo

Kaufmann SHE & Flynn JL. CD8 T cells in tuberculosis. In: Cole ST, Eisenach D, McMurray DN, Jacobs Jr WR, org. **Tuberculosis and the tubercle bacillus**. Washington: ASM Press. 2005. p. 155–164.

Kaufmann SH & Hess J. **Impact of intracellular location of and antigen display by intracellular bacteria: implications for vaccine development**. Immunol Lett. 1999; 65 (1-2): 81–4

Kidd P. **Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease**. Altern Med Rev. 2003; 8 (3): 223-246.

Kremer L, Dupre L, Riveau G, Capron A, Loch C. **Systemic and mucosal immune responses after intranasal administration of recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin expressing glutathione S-transferase from *Schistosoma haematobium*.** Infect Immun. 1998; 66 (12): 5669-5676.

Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, Graeber TG, Sieling PA, Liu YJ, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. **TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells.** Nat Med. 2005, 11 (6): 653–660

Laemmli UK. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature. 1970, 227: 680-685

Larsen NG. **Drug and Device Development Guide.** Copenhagen: Medicon Valley Academy. 2005. Cap. 1: Development – definition, costs and time. p. 9-13

Lebens M, Su J, Czerkinsky C, Holmgren J. **Current status and future prospects for a vaccine against schistosomiasis.** Expert Rev Vaccines. 2004; 3 (3): 315-328.

Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, Sherman DR. **Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation.** J Infect Dis. 2003; 187 (1): 117–123

MacCullough KC & Summerfield A. **Basic concepts of immune response and defense development.** ILAR J. 2005; 46 (3): 230–240.

Mantovani A, Sica A & Locati M. **Macrophage polarization comes of age.** Immunity. 2005; 23 (4): 344 – 346

MacFarland J. **Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines.** J Am Med Assoc. 1907; 14: 1176-1178

Medeiros MA. **Desenvolvimento do *Mycobacterium bovis* BCG como sistema de expressão de antígeno vacinal de *Bordetella pertussis*.** Pelotas; 2001. Doutorado – Universidade Federal de Pelotas.

Medeiros MA, Armoa GR, Dellagostin AO, McIntosh D. **Induction of humoral immunity in response to immunization with recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the S1 subunit of *Bordetella pertussis* toxin.** Can. J. Microbiol. 2005; 51 (12): 1015 - 20.

Metz B, Hendriksen CFM, Jiskoot W, Kersten GFA. **Reduction of animal use in vaccine quality control: opportunities and problems.** Vaccine. 2002, 20: 2411 – 2430

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Annette MH. **M1/M2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm.** J Immunol. 2000; 164: 6166-6173.

Misumi S, Endo M, Mukai R, Tachibana K, Umeda M, Honda T, Takamune N, Shoji S. **A novel cyclic peptide immunization strategy for preventing HIV-1/AIDS infection and progression.** J Biol Chem. 2003; 278 (34): 32335-43.

- Mosmann TR. **Cytokines: is there biological meaning?** Curr. Opin Immunol. 1991, 3: 311-314
- Mosmann TR & Coffman RL. **Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells.** Adv. Immunol. 1989, 46: 111-147
- Murray A, Winter N, Lagranderie M, Hill DF, Rauzier J, Timm J, Leclerc C, Moriaty KM, Gheorghiu M, Gicquel B. **Expression of *Escherichia coli* beta-galactosidase in *Mycobacterium bovis* BCG using an expression system isolated from *Mycobacterium paratuberculosis* which induced humoral and cellular immune responses.** Mol Microbiol. 1992, 6 (22): 3331-3342.
- NIAID - *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*. **Understand vaccines: What they are / How they work.** Washington: NIH publication, 2003. 55 pp.
- Ohara N & Yamada T. **Recombinant BCG vaccines.** Vaccine. 2001, 19: 4089–4098
- Oliveira MM, Charlab R, Pessolani MC. ***Mycobacterium bovis* BCG but not *Mycobacterium leprae* induces TNF-alpha secretion in human monocytic THP-1 cells.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96 (7): 973-978.
- Parlow TG. A resposta imunológica. In: Parlow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB, org. **Imunologia médica.** 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004. p. 52-60.
- Pearce EJ & McDonald AS. **The immunobiology of schistosomiasis.** Nat Rev Immunol. 2002; 2 (7):499-511.
- Plotkin SA. **Six revolutions in vaccinology.** Pediatr Infect Dis J. 2005a, 24 (1): 1–9
- _____. **Vaccines: past, present and future.** Nat Med. 2005b, 11 (4 Suppl): S5-S11.
- Plotkin SL & Plotkin SA. A short history of vaccination. In: Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines.** 4th ed. Philadelphia: Saunders, 2004: 1-12
- Presgrave OAF. **Teste de liberação de citocinas como método alternativo ao ensaio de pirogênio em coelhos no controle da qualidade de produtos injetáveis.** Rio de Janeiro; 2003. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] - Fundação Oswaldo Cruz
- Presgrave OAF. Alternativas para animais de laboratório: do animal ao computador. In: Andrade A, Pinto SC & Oliveira RS, org. **Animais de laboratório: criação e experimentação.** Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002. p. 361–368
- Rappuoli R. **From Pasteur to genomics: progress and challenges in infectious diseases.** Nat Med. 2004, 10 (11): 1177–1185
- Reis e Sousa C. **Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity.** Curr Opin Immunol. 2004a, 16 (1): 21–5

_____. **Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls.** *Semin Immunol.* 2004b, 16 (1): 27–34

Rezende CA, De Moraes MT, de Souza Matos DC, McIntoch D, Armoa GR. **Humoral response and genetic stability of recombinant BCG expressing hepatitis B surface antigens.** *J Virol Methods* 2005; 125 (1): 1–9.

Ribeiro de Jesus A, Araújo I, Bacellar O, Magalhães A, Pearce E, Harn D, Strand M, Carvalho EM. **Human immune responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens.** *Infect Immun.* 2000; 68 (5): 2797–803

Ritelli M, Amadori M, Tagliabue S, Pacciarini ML. **Use of a macrophage cell line for rapid detection of *Mycobacterium bovis* in diagnostic samples.** *Vet Microbiol.* 2003; 94: 105-120.

Rosenthal KS & Zimmerman DH. **Vaccines: All things considered.** *Clin Vaccine Immunol.* 2006; 13 (8): 821-829

Russell WMS. & Burch RL. **The Principles of Humane Experimental Technique.** London: Methuen. Smyth, D. 1959. 238 pp.

Saalmüller A. **New understanding of immunological mechanisms.** *Vet Microbiol.* 2006; 117 (1): 32-8.

Sander B. Skansén-Saphir, Damm O, Hakansson L, Andersson J, Andersson U. **Sequential production of Th1 and Th2 cytokines in response to live bacillus Calmette-Guerin.** *Immunology.* 1995, 86 (4): 512–8

Santiago ACC. **Correlação entre a colonização pelos isolados clínicos de *Mycobacterium avium* e a imunidade celular específica a antígenos micobacterianos em pacientes HIV-1 positivos.** Rio de Janeiro 2003. Mestrado [Instituto Oswaldo Cruz] FIOCRUZ.

Santos JPS. **Avaliação da estabilidade estrutural e funcional de vetores plasmidiais recombinantes bifuncionais (*Escherichia coli* – *Mycobacterium*) em *Mycobacterium bovis* BCG.** Rio de Janeiro; 2002. Mestrado [Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes] – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Serruto D & Rappuoli R. **Post-genomic vaccine development.** *FEBS Lett.* 2006, 580: 2985–2992.

SLIPE – Sociedade Latinoamericana de Infectologia Pediátrica & API – Associação Panamericana de Infectologia. **Manual de Vacinas da América Latina.** Madrid: Euro RSCG Life Esquema, 2005. 620 pp.

Smith KC & Starke JR. Bacille Calmette-Guérin vaccine. In: Plotkin SA & Orenstein WA, org. **Vaccines.** 4ª ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2004 p. 179–210

Smith SG, Patel PM, Selby PJ, Jackson AM. **The response of human dendritic cells to recombinant adenovirus, recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus**

Calmette Guerin and biolistic methods of antigen delivery: different induction of contact-dependant and soluble signals. Immunol Lett. 2001; 76 (2): 79-88.

Standiford TJ. **Anti-inflammatory cytokines and cytokine antagonists.** Curr Pharm Des. 2000, 6 (6): 633-49.

Stokes RW & Doxsee D. **The receptor-mediated uptake, survival, replication, and drug sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* within the Macrophage-like cell line THP-1: A comparison with human monocyte-derived macrophages.** Cell Immunol. 1999; 197: 1-9

Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, Bennett LT, Bansal GP, Young JF, Lee MH, Hatfull GF, Snapper SR, Barletta RG, Jacobs WR, Bloom RR. **New use of BCG for recombinant vaccines.** Nature. 1991, 351: 456-460.

Takahashi H. **Antigen presentation in vaccine development.** Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2003, 26 (5-6): 309–28

Tendler M, Brito CA, Vilar MM, Serra-Freire N, Diogo CM, Almeida MS, Delbem ACB, Silva JF, Savino W, Garrat RC, Katz N, Simpson AJG. **A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine.** Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93: 269–273

Theus SA, Cave MD & Eisenach KD. **Activated THP-1 cells: an attractive model for the assessment of intracellular growth rates of *Mycobacterium tuberculosis* isolates.** Infect Immun. 2004; 72(2): 1169-1173

_____. **Intracellular macrophage growth rates and cytokine profiles of *Mycobacterium tuberculosis* strains with different transmission dynamics.** Infect Dis. 2005; 191 (3): 453–60

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. **Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1).** Int. J. Cancer. 1980; 26: 171-176

Varaldo PB, Leite LCC, Dias WO, Miyaji EN, Torres FIG, Gebara VC, Armôa GRG, Campos AS, Matos DCS, Winter N, Gicquel B, Vilar MM, McFadden J, Almeida MS, Tendler M, McIntosh D. **Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* protects mice from cercarial challenge.** Infect Immun. 2004; 72(6): 3336-3343

Varaldo PB, Miyaji EN, Vilar MM, Campos AS, Dias WO, Armôa GRG, Tendler M, Leite LCC, McIntosh D. **Mycobacterial codon optimization of the gene encoding the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* in recombinant *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin enhances protein expression but not protection against cercarial challenge in mice.** FEMS Immunol Med Microbiol. 2006, 48 (1): 132-139.

Wack A & Rappuoli R. **Vaccinology at the beginning of the 21st century.** Curr Opin Immunol. 2005, 17 (4): 411– 418

WHO. *World health organization*. **TDR Progress: New and Improved Tools - New candidates in development: vaccine development schistosomiasis**. Geneva: 2000. [capturado em 16 de outubro de 2004]. Disponível em: <http://who.int/tdr/research/progress9900/tools/vaccine-schistossomiasis.htm>.

_____. **Global Plan to stop tuberculosis 2006-2015**. Geneva: WHO Press. 2006: 1-17

Wynn TA & Hoffmann KF. **Defining a schistosomiasis vaccination strategy – it is really Th1 versus Th2?** *Parasitol Today*. 2000; 16, (11): 497–501.

Xia HH, Lam SK, Chan AO, Lin MC, Kung HF, Ogura K, Berg DE, Wong BC. **Macrophage migration inhibitory factor stimulated by *Helicobacter pylori* increases proliferation of gastric epithelial cells**. *World J Gastroenterol*. 2005, 11 (13): 1946–1950

Xing Z, Zganiacz A & Santosuosso M. **Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF-alpha and nitric oxide from macrophages via IFN-gamma induction**. *J Leukoc Biol*. 2000; 68: 897-902.

Zhao G, Etherton TD, Martin KR, Vanden Heuvel JP, Gillies PJ, West SG, Kris-Etherton PM. **Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells**. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 336 (3): 909–917.