



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

MONIQUE RIBEIRO DE LIMA

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E IMUNOGENICIDADE
DA VACINA CANDIDATA AO CONTROLE DA
TUBERCULOSE pVAX-HSP65 ADMINISTRADA POR
ELETROPORAÇÃO EM MACACOS CYNOMOLGUS
(*Macaca fascicularis*)**

Rio de Janeiro

2012

Avaliação da segurança e imunogenicidade da
vacina candidata ao controle da tuberculose pVAX-
hsp65 administrada por eletroporação em macacos
cynomolgus (Macaca fascicularis)

MONIQUE RIBEIRO DE LIMA

Tese de Doutorado apresentada ao
Curso de Pesquisa Clínica em
Doenças Infecciosas do Instituto de
Pesquisa Clínica Evandro Chagas
para a obtenção do grau de Doutor
em Ciências.

Orientador: Prof Dra Maria da Glória
Bonecini-Almeida

Rio de Janeiro

2012

MONIQUE RIBEIRO DE LIMA

Avaliação da segurança e imunogenicidade da
vacina condidata ao controle da tuberculose pVAX-
hsp65 administrada por eletroporação em macacos
cynomolgus (Macaca fascicularis)

Tese apresentada ao Curso de
Pesquisa Clínica em Doenças
Infecciosas do Instituto de Pesquisa
Clínica Evandro Chagas para a
obtenção do grau de Doutor em
Ciências.

Orientadora: Dra. Maria da Glória Bonecini-Almeida

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Dra. Cynthia Silveira Horn

Doutor em Ciências/IPEC -Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Márcia Cristina Ribeiro Andrade

Doutor em Ciências/CECAL - Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Andrea Henriques Pons

Doutor em Ciências/IOC - Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Renato Porrozi

Doutor em Ciências/IOC - Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Célio Lopes Silva

Doutor em Ciências/FMRP- Universidade de São Paulo

Dedido à vida, pois celebro hoje um desfazer de um tempo que não existe mais, assim como a vela em cima do bolo: acendeu, apagou e acabou.

Não quero risos previsíveis, nem choros piedosos, pois a imperfeição é bela e a loucura é genial.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Vera e aos meus irmãos Rodrigo, Diego, Igor e Gabriela, assim como todos os meus familiares, pessoas que representaram, para mim, a união nos momentos importantes, exemplos de coragem, amor e determinação.

A minha médica e grande amiga Marcelle Dinis, responsável por revelar minha inconstância, desvendar meu silêncio e trazer de volta minha alegria.

A minha terapeuta Wany Martins que fez tornar ao menos suportável o convívio comigo mesma. Uma grande e maravilhosa surpresa na minha vida.

A minha grande amiga Larissa Catharina, uma irmã que escolhi e uma filha que adotei. “Um amor que não se mede um amor que não se pede”.

A minha querida amiga Dr^a Ana Teresa Fernandes por todo auxílio com a redação da tese, uma colaboração num momento muito importante da minha vida.

Aos amigos Márcio Mantuano e Andréa Lamoglia, pessoas sem as quais, grande parte deste trabalho não seria possível.

Aos meus grandes amigos de profissão, os Médicos Veterinários: Alexandra Borges, Ana Paula Cajueiro, Anna Carolina Donato, Bruno Peres, Kátia Silva, Leonardo Gatto, Vanessa Gonçalves e Vanesa Duque, que facilitaram minha jornada com suas amizades.

À Dr^a Cynthia Horn, uma pessoa entusiasta e motivadora do meu desenvolvimento profissional e pessoal.

A toda equipe do Laboratório de Imunologia: Diego Carletti, Danilo Parmera, Carla Blal, Maristela Lima, Silvia Oliveira, Regina Pimenta, Maíra Albuquerque, Márcia Rocha, Natália Rocha, Davi Oliveira, Igor Teixeira, um grupo que é exemplo de alegria e entusiasmo.

À Dr^a Márcia Cristina Andrade, mais que uma professora, uma amiga com quem aprendi muito e busquei inspiração que me trouxe cada vez mais experiência e amadurecimento.

Aos colaboradores do Laboratório de Patologia Clínica e Laboratório de Parasitologia/lpec com o auxílio na realização dos exames.

Aos colaboradores do Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos/IOC. Em especial à Dr^a Andrea Henriques Pons, pelo acompanhamento do meu projeto e pelas apreciações sempre bem-vindas e enriquecedoras.

Aos técnicos responsáveis pelo funcionamento do contêiner experimental na qual depus confiança e com os quais pude contar: Antonio Américo e André Bezerra.

Aos funcionários do almoxarifado, farmácia, Semag, Dirac, Soam, que deram todo suporte operacional ao projeto.

À querida Priscilla Tavares pelo imenso apoio com as questões da pós-graduação.

A minha revisora, Dr^a Ana Cristina Leandro, pela disponibilidade e enriquecimento dos meus dados, dando-me subsídio para o acabamento deste trabalho.

À professora e orientadora Dr^a. Maria da Glória Bonecini-Almeida pelo seu apoio e inspiração, no amadurecimento dos meus conhecimentos e conceitos, e na confiança em mim depositada, que me levaram a execução e conclusão deste trabalho. O meu muito obrigada.

Aos animais, que foram o instrumento do estudo. Talvez nossa contribuição à ciência tenha sido pequena, porém o aprendizado foi enorme. Criaturas ímpares e fascinantes, os meus sinceros agradecimentos.

“Dizem que o bonobo é bem mais dócil do que o chimpanzé. Que é parente distante de toda Maria, de qualquer José. Ao lado de um bonobo outros bichos parecem manés. Eu bem que preferia ser bonobo a ser um chimpanzé” (Lulu Santos).

Lima, M.R. **Avaliação da segurança e da imunogenicidade da vacina candidata para o controle da tuberculose pVAX-hsp65 administrada por eletroporação em macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*)**. Rio de Janeiro, 2012. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] - Instituto de Pesquisa Evandro Chagas.

RESUMO

A tuberculose é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* e foi declarada emergência em saúde pública mundial pela Organização Mundial de Saúde. A tuberculose persiste como um problema de saúde mundial, em parte, porque os indivíduos infectados, muitas vezes, não aderem ao longo tratamento de forma devida. A ampla vacinação com a BCG reduziu a ocorrência das formas mais graves de tuberculose em crianças, porém, a forma adulta pulmonar é responsável pela principal causa de morte no mundo. A validação de novas vacinas para utilização na clínica humana, passa pela necessidade de se testá-las, ainda em fase pré-clínica, em modelo animal que desenvolva e reproduza de forma semelhante a doença humana. Avaliamos, neste estudo, os aspectos referentes à segurança do método de eletroporação e a imunogenicidade da vacina pVAX-hsp65, administrada em 3 doses com intervalo de 1 mês cada, em macacos cynomolgus. Foram realizadas análises clínicas, hemograma, teste de função renal, hepática, além da avaliação das subpopulações celulares (TCD4, TCD8, NK, linfócitos B, células dendríticas mielóide e plasmacitóide), marcador de ativação celular (HLA-DR e CD69), grânulos citotóxicos (granzima B/perforina), citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-10, IL-2, IL-4, IL-5 e IL-6), marcadores de proliferação (Ki-67) e ligados a apoptose (Bcl-2). A vacina se mostrou segura, sem causar efeitos adversos relacionados ao local da inoculação, não induziu disfunção hepática ou renal nem alterações hematológicas. A vacinação não induziu conversão ao teste tuberculínico. Observamos um aumento de células T CD4⁺ de memória central, o que caracteriza ativação celular. A indução preferencial de células dendríticas com perfil plasmacitóide foi evidenciada de forma transitória. O perfil de citocinas gerado após a vacinação foi preferencialmente induzido pela

expressão de IFN- γ em células NK e uma tendência ao aumento em linfócitos T CD4 e CD8, o que levaria ao controle da replicação bacteriana pela presença de resposta inflamatória do tipo Th1. O controle desta resposta pode também estar sendo realizada pela exuberante resposta de TNF- α e IL-6 que modularia a formação do granuloma e contenção da micobactéria. Assim, nossos resultados apontam para a formação de uma resposta protetora periférica induzida pela vacina pVAX-hsp65 em macacos cynomolgus.

Palavras-chave: vacina, tuberculose, macacos cynomolgus, pVAX-hsp65, eletroporação, imunogenicidade.

Lima, M.R. **Evaluation of safety and immunogenicity of the vaccine candidate for tuberculosis control pVAX-hsp65 administered by electroporation in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)**. Rio de Janeiro, 2012. Doctor [Science thesis in Clinic research in Infectious] – Instituto de Pesquisa Evandro Chagas.

ABSTRACT

Tuberculosis is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* and was declared a public health emergency by World Health Organization. Tuberculosis remains a worldwide health problem, partly because infected individuals often refuse the long-treatment. Widespread vaccination with BCG reduced the occurrence of severe forms of tuberculosis in children; however, pulmonary tuberculosis in adult is the main cause of death worldwide. To validate new vaccines for clinical use in human, preclinical tests in animal model to reproduce human disease is necessary. Our main goal was to evaluate the safety and immunogenicity of a new vaccine pVAX-hsp65, administered by electroporation in cynomolgus monkeys in three doses with one month apart. Clinical analyzes were performed: Red and white blood cells count, renal and liver functional test, evaluation of lymphocyte subsets (CD4, CD8, NK, B lymphocytes, and myeloid and plasmacytoid dendritic cells), markers for cell activation (HLA-DR and CD69), activation of cytotoxic granules (granzyme B / perforin), cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-10, IL-2, IL-4, IL-5 and IL-6), proliferation (Ki-67) and anti-apoptosis (BCL-2) markers. The vaccine proved to be safe, with no adverse effects related to the inoculation site and did not induce liver or kidney dysfunction or hematological changes. The vaccination did not convert the tuberculin skin test. We observed an enhancement of central memory TCD4 lymphocytes which indicates cell activation. The preferential induction of plasmacytoid dendritic cells was transient. The profile of cytokines generated after vaccination was preferentially induced by IFN- γ expression in NK cells, showing a tendency to increase in TCD4⁺ and CD8⁺ cells, which would lead to control of bacterial growth by induction of a protective Th1 response. The robust immune response observed may either be controlled by secretion of TNF- α and IL-6 that are able to modulate the granuloma maturation and mycobacteria elimination. Thus, our

results indicates that the pVAX-hsp65 vaccination, was able to induce a peripheral protective immune response in cynomolgus monkeys.

Key-words: vaccine, tuberculosis, DNA-hsp65, cynomolgus monkey, electroporation, immunogenicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ministério da Saúde – Brasil 2008. Manual de vigilância epidemiológica de eventos adversos pós-vacinação.....	32
Figura 2 - Imagem do contêiner de experimentação (vista de fora), onde os animais foram alojados durante o estudo.....	45
Figura 3 - Etapas da vacinação com pVAX-hsp65 em macacos cynomolgus.....	47
Figura 4 – Delineamento experimental.....	48
Figura 5 - Cinética da avaliação dos parâmetros hematológicos dos macacos cynomolgus vacinados com pVAX-hsp65 (1).....	65
Figura 6 - Cinética da avaliação dos parâmetros hematológicos dos macacos cynomolgus vacinados com pVAX-hsp65 (2).....	66
Figura 7 - Cinética da avaliação dos parâmetros de creatinina e uréia dos macacos cynomolgus vacinadas com pVAX-hsp65.....	69
Figura 8 - Cinética da avaliação da glicose sérica perfil e lipídico (triglicerídeos e colesterol) dos macacos cynomolgus vacinadas com pVAX-hsp65.....	70
Figura 9 - Cinética da avaliação dos parâmetros que avaliam a função hepática nos macacos cynomolgus vacinadas com pVAX-hsp65 (1).....	71
Figura 10 - Cinética da avaliação dos parâmetros que avaliam a função hepática nos macacos cynomolgus vacinadas com pVAX-hsp65 (2).....	72
Figura 11 - Painel da análise de citometria de fluxo (1).....	77
Figura 12 - Cinética da avaliação de células TCD4 e TCD8.....	78
Figura 13 - Cinética da avaliação de linfócitos B e NK.....	79
Figura 14 - Painel da análise de citometria de fluxo (2).....	82
Figura 15 - Cinética da avaliação de linfócitos TCD4 de memória central e memória efetora	83
Figura 16 - Cinética da avaliação de linfócitos TCD8 de memória central e memória efetora	84
Figura 17 - Cinética da avaliação de linfócitos TCD4 e linfócitos B expressando a molécula HLA-DR.....	87
Figura 18 - Painel da análise de citometria de fluxo (3).....	88
Figura 19 - Cinética da avaliação de células dendríticas mieloides e plasmocitoides.....	89
Figura 20 - Painel da análise de citometria de fluxo (4).....	92

Figura 21 - Painel da análise de citometria de fluxo (5).....	93
Figura 22 - Avaliação do marcador de ativação celular CD69 em linfócitos TCD4, TCD8 e B.....	95
Figura 23 - Avaliação da dupla marcação de granzima B/perforina em linfócitos TCD8 e células NK.....	96
Figura 24 - Avaliação da expressão da citocina IFN- γ em células TCD4, TCD8 e NK.....	98
Figura 25 - Avaliação da expressão da citocina TNF- α em células TCD4, TCD8 e NK.....	100
Figura 26 - Avaliação da expressão das citocinas IL-12 em monócitos e IL-10 em células TCD4 e TCD8.....	102
Figura 27 - Avaliação da expressão de KI-67 em células TCD4, TCD8 e linfócitos B.....	104
Figura 28 - Avaliação da expressão do marcador antiapoptótico Bcl-2 em células TCD4 e TCD8.....	105
Figura 29 - Avaliação da expressão das citocinas Th1/Th2: IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5 e IL-6 TNF- α no sobrenadante de cultura.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Vacinas candidatas para o controle da tuberculose em Fase Clínica.....	17
Tabela 2: Triagem sorológica dos macacos cynomolgus disponibilizados pelo Cecal, 12 destes animais foram selecionados para o projeto.....	43
Tabela 3: Relação de anticorposmonoclonais utilizados e seus clones.....	52
Tabela 4: Relação de anticorposmonoclonais utilizados e seus clones.....	56
Tabela 5: Valores hematológicos pré-vacinais dos macacos cynomolgus que serão utilizados como base para as comparações pós-vacinais.....	62
Tabela 6: Valores bioquímicos pré-vacinais dos macacos cynomolgus que serão utilizados como base para as análises pós-vacinais.....	63
Tabela 7: Cinética da avaliação dos parâmetros hematológicos dos macacos cynomolgus vacinados com pVAX-hsp65.....	67
Tabela 8: Cinética da avaliação dos parâmetros bioquímicos dos macacos cynomolgus vacinados com pVAX-hsp65.....	73
Tabela 9: Avaliação da reação de intradermoreação a tuberculina de mamíferos em macacos cynomolgus vacinados com pVAX-hsp56 por eletroporação.....	75
Tabela 10: Cinética da avaliação dos valores percentuais e absolutos de células TCD4, TCD8, linfócitos B e células Natural killer dos macacos cynomolgus vacinados com pVAX-hsp65 (n=8) e animais controle (n=4).....	80
Tabela 11: Cinética da avaliação dos valores percentuais e absolutos de células TCD4, TCD8 de memória central (MC) e memória efetora (ME) em macacos cynomolgus vacinados com pVAX-hsp65 (n=8) e animais controle (n=4).....	85
Tabela 12: Cinética da avaliação dos valores percentuais e absolutos de células TCD4 e linfócitos B expressand HLA-DR e de células dendríticas mieloides (mDC) e plasmocitoide (pDC) em macacos cynomolgus vacinados com pVAX-hsp65 (n=8) e animais controle (n=4).....	90
Tabela 13: Cinética da avaliação dos valores percentuais de marcadores intracelulares em macacos cynomolgus vacinados com pVAX-hsp65 (n=8) e animais controle (n=4).....	106
Tabela 14: Cinética da avaliação das citocinas Th1/Th2 em sobrenadante de cultura em macacos cynomolgus vacinados com pVAX-hsp65 (n=8) e animais controle (n=4).....	109

LISTA DE ABREVIATURAS

CD	<i>Cluster of differentiation</i> , Grupo de diferenciação
CD14	Antígeno expresso em monócitos, macrófagos e células de Langerhans. Baixa expressão é observada em neutrófilos e células B
CD16	Antígeno expresso em células NK, granulócitos, macrófagos ativados e em uma subpopulação de células T
CD20	Antígeno expresso na maioria de células B
CD25	Subunidade alfa do receptor IL-2
CD3	Antígeno expresso em linfócitos T
CD4	Molécula acessória presente na membrana de linfócitos T auxiliares, monócitos/macrófagos e células dendríticas
CD69	Antígeno rapidamente expresso após a ativação de linfócitos
CD8	Molécula acessória presente na membrana de linfócitos T com atividade citotóxica. células <i>natural killer</i> (NK) e células dendríticas
CD95/FAS	Receptor FAS, medeia sinais que levam a morte induzida por ativação
CD95/FAS-L	Ligante FAS, induz apoptose com células expressando FAS
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , ácido etilenodiaminotetracético
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> , isotiocianato de fluoresceína
FSC	<i>Forward scatter</i> , dispersão frontal
HLA-DR	Human leukocyte antigen-DR, antígeno leucocitário humano-DR
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleucina
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , complexo principal de histocompatibilidade
NK	<i>Natural Killer</i>
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells, células mononucleares do sangue periférico
PerCP	<i>Peridinin-chlorophyll-protein</i>
SSC	<i>Side scatter</i> , dispersão lateral
TNF- α	Tumoral necrosis factor- α , fator de necrose tumoral do tipo α

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 - A TUBERCULOSE COMO UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA.....	02
1.2 - RESPOSTA IMUNE AO <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	07
1.3 - ESTRATÉGIAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE VACINAS CONTRA A TUBERCULOSE	14
1.3.1 – Vacinas candidatas para o controle da tuberculose	17
1.3.1.1 Vacinas com micobactéria viva atenuada	17
1.3.1.2 Vacinas de subunidades	20
1.3.1.3 Vacinas de DNA	23
1.3.1.4 Vacina DNA-heat shock protein 65kDa (DNA-hsp65)	25
1.4 – O USO DA ELETROPORAÇÃO EM VACINAS	29
1.5 - IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DOS EVENTOS ADVERSOS NO DESENVOLVIMENTO DE VACINAS	31
1.6- ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS PARA DESENVOLVIMENTOS DE VACINAS CONTRA TUBERCULOSE	33
2 OBJETIVOS	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1- ANIMAIS	41
3.1.1 - Alojamento dos animais	44
3.1.2 Procedimento de contenção	45
3.1.3 - Obtenção de amostras de sangue	46
3.2 – ESQUEMA VACINAL	46
3.3- EXAMES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS	49
3.4 – AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS EVENTOS ADVERSOS	49
3.5 – TESTE TUBERCULÍNICO	50
3.6 - AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES NOS MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR INDUZIDAS PELA VACINAÇÃO COM PVAX-HSP65	51
3.6.1 - Avaliação do perfil de linfócitos, células natural killer e monócitos periféricos	51
3.6.2 - Avaliação do perfil de marcadores de memória central e memória efetora	53

3.6.3 - Avaliação do perfil de células dendríticas linfóides e mielóides	53
3.7 - ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO	54
3.8 – AVALIAÇÃO DE MARCADORES INTRACELULARES	54
3.9 – CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS DO TIPO TH1 E TH2 NOS SOBRENADANTES DE CULTURAS	58
3.10 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
4 RESULTADOS	60
4.1. SELEÇÃO DOS ANIMAIS	61
4.2. EXAMES PRÉ-VACINAIS	61
4.3 – ANÁLISE CLÍNICA PÓS-VACINAL	63
4.3.1. Avaliação das alterações hematológicas	63
4.3.2- Perfil bioquímico sérico	68
4.3.2.1 Testes de função renal	68
4.3.2.2 Perfil lipídico e glicose sérica	69
4.3.2.3 Testes de função hepática	70
4.4 - AVALIAÇÃO DOS EVENTOS ADVERSOS	74
4.5- TESTE TUBERCULÍNICO	74
4.6 - AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR	76
4.6.1 - Avaliação do perfil de linfócitos e células natural killer periféricos induzidos pela vacinação com pVax-hsp65 por eletroporação	76
4.6.2 - Avaliação de marcadores de células de memória central e efectoras	81
4.6.3 – Avaliação do marcador de ativação celular HLA-DR.....	86
4.6.4 – Avaliação de células dendrítica mielóides e plamocitoides.....	88
4.7- AVALIAÇÃO DE MARCADORES INTRACELULARES	91
4.7.1 – Avaliação de marcador de ativação celular CD69	94
4.7.2 – Avaliação da produção de grânulos de granzima B e perforina	96
4.7.3 – Avaliação da cinética do perfil de citocinas intracelulares por citometria de fluxo em macacos cynomolgus vacinados com pVax-hsp65 por eletroporação	97
4.7.4 Avaliação da expressão do marcador ki67, indicador de proliferação celular	103
4.7.5 Avaliação da expressão do marcador anti-apoptótico Bcl-2.....	105

4.7.6 - Avaliação do perfil de citocinas Th1/Th2 em macacos vacinados com cynomolgus hsp65 pVax por eletroporação	107
5 DISCUSSÃO	110
6 CONCLUSÕES	122
7 REFERÊNCIAS	126

1-Introdução

1- INTRODUÇÃO

1.1- A TUBERCULOSE COMO UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*. A doença foi declarada emergência em saúde pública mundial pela Organização Mundial de Saúde (WHO/OMS), na qual prevê que um bilhão de indivíduos serão infectados, com 35 milhões de mortes causadas por TB até 2020. A TB persiste como um problema de saúde mundial, em parte, porque os indivíduos infectados, muitas vezes, não aderem ao longo tratamento de forma devida. Isto é particularmente verdadeiro em países em desenvolvimento, onde ocorrem mais de 95% das infecções. A não adesão ao tratamento tem contribuído para a pandemia em vigor, aumentando a probabilidade de transmissão e sustentando o desenvolvimento de cepas de *M. tuberculosis* multi-droga resistentes (MDR) à rifampicina e a isoniazida, medicamentos de primeira linha contra a TB. Desde a descoberta das cepas MDR-TB na década de 1990, o padrão de resistência da TB tem evoluído, e, com isso, cepas resistentes a ambos os fármacos, tanto de primeira quanto de

segunda linha, foram identificadas (WHO, 2008). O primeiro quimioterápico para o controle da TB foi introduzido entre os anos de 1940 e 1950 na forma de ácido para-aminosalicílico, estreptomicina e antibióticos orais, como a isoniazida e a rifampicina, que ainda permanecem os principais agentes usados para o tratamento da TB. Indivíduos com TB latente e TB ativa podem em sua maioria serem efetivamente tratados, no entanto, o bacilo pode adquirir resistência às drogas, sendo assim, necessária a combinação de regimes quimioterápicos.

Segundo a OMS, 32% da população mundial está infectada com o *M. tuberculosis* e, portanto, com maior risco de adoecer por reativação e, também, por infecção exógena. Entre os anos de 1850 e 1950, um bilhão de pessoas faleceram em decorrência da TB. Somente no ano de 1996, mais pessoas morreram vitimadas pela TB do que em qualquer ano da história mundial (WHO, 2005). De acordo com OMS, 1,7 milhão de homens, mulheres e crianças morreram em decorrência da doença em 2009, com mais de 9,4 milhões de novos casos registrados (WHO, 2010). Esta epidemia global continua a devastar populações pobres e marginalizadas em todo o mundo, sendo a segunda doença infecciosa com mais vítimas fatais, perdendo apenas para a HIV/Aids. A TB ocorre mais frequentemente na adolescência e na idade adulta (15-49 anos), afetando os segmentos mais produtivos da sociedade, induzindo a um ônus substancial sobre as economias nacionais (Moradi *et. al.*, 2012).

A meta estratégica na redução da transmissão, morbidade e mortalidade da TB (ao mesmo tempo minimizando o risco do desenvolvimento de resistência aos medicamentos) fazem parte de um esforço geral para a

redução da morbidade e mortalidade relacionadas ao HIV. Para se alcançar estas metas, são necessários esforços para a implementação de intervenções de eficácia comprovada, pesquisas para determinar como programar estas intervenções e monitorar o seu impacto, bem como a elaboração de novas intervenções, incluindo as específicas no controle da tuberculose (por ex: vacinas mais eficazes, melhores métodos de diagnóstico, de abordagens, de prevenção e tratamento). Há uma preocupação crescente em relação ao uso de organismos vivos em indivíduos imunocomprometidos, fato especialmente agravante na co-infecção TB-HIV. Com isso, o descobrimento de novas drogas e de vacinas candidatas contra TB deverão ser uma das preocupações prioritárias dos programas de HIV/Aids (WHO, 2002).

Na tentativa de desenvolver uma vacina, Albert Calmette e Camille Guérin atenuaram isolados de *M. bovis*, obtendo, entre os anos de 1906 e 1919, o *Bacille Calmette Guerin* (BCG), através de passagens sucessivas em meios de cultura. A vacina BCG foi testada pela primeira vez em humanos em 1921 e a primeira imunização em massa foi realizada em indivíduos com resultados negativos ao teste PPD (derivado protéico purificado de *M. tuberculosis*) na Polônia em 1948. Após a Segunda Guerra Mundial o uso da BCG foi amplamente divulgado em vários países, estimulado pela UNICEF, *Scandinavian Red Cross Societies* e OMS (Palmer *et al.*, 1958, Ten Dam, 1984).

A vacina BCG tem feito parte do programa da OMS de expansão da imunização infantil desde 1974, sendo administrada logo após o nascimento, em países com alta carga de incidência de casos da doença (WHO, 2004). A BCG permanece como a única vacina licenciada contra a TB, sendo a mais

antiga vacina em uso, porém sua eficácia é incerta. Depois de vários estudos, verificou-se que a sua eficácia variava de zero a 80% entre as diferentes populações do mundo submetidas à vacinação (Rodrigues *et al.*, 1993). Várias razões têm sido propostas para explicar e entender estas diferenças observadas. Elas poderiam estar relacionadas com: a variabilidade genética entre as diferentes cepas; a deleção de genes essenciais para a formação da imunidade protetora; a virulência do bacilo da TB em diversas regiões; diferenças genéticas e nutricionais das populações infectadas; baixa resposta das células TCD8 apesar de uma boa resposta de células TCD4; exposição às micobactérias ambientais atípicas; infecções crônicas por helmintos interferindo na resposta imunológica; a variação nos métodos de imunização; e, possivelmente, com o emprego de diversas metodologias para coleta dos dados e análise dos resultados (Frappier *et al.*, 1971, Ten Dam, 1984; Rodrigues *et al.*, 1993; Rowland & McShane, 2011).

A ampla vacinação com a BCG reduziu a ocorrência das formas mais graves de TB, isto é, a TB meníngea e formas disseminadas da TB em crianças (OMS, 2004). Porém, a forma adulta pulmonar é responsável pela principal causa de morte de TB no mundo (Rodrigues *et al.*, 1993). Não obstante, o uso da BCG resulta na conversão ao teste de reação intradérmica com PPD em muitas pessoas. A duração desta hipersensibilidade é variável e diminui com o tempo. Em alguns programas de vacinação, o teste PPD negativo é um indicador de revacinação com a BCG, porém, há uma pobre correlação entre a conversão ao teste e a proteção imune ao *M. tuberculosis*, e também, não há evidência de que a diminuição da sensibilidade ao teste PPD

esteja associado com diminuição da resposta imune do hospedeiro (WHO, 1995; Rodrigues *et. al.*, 2005; Roth *et. al.*, 2010).

A vacina BCG tem sido bem tolerada com históricos de segurança de mais de 80 anos e com estimativa de mais de 100 milhões de doses administradas a cada ano. As complicações com a vacinação com a BCG são extremamente raras. Reações locais (ulcerações graves e linfadenite regional) ocorrem numa proporção de menos de 1/mil indivíduos e a doença fatal causada pela BCG acomete menos de 2/1 milhão de vacinados (WHO, 2004). A maioria das complicações ocorre em indivíduos imunocomprometidos, sendo a imunização, com a BCG, contra indicada pela OMS em pessoas infectadas com o HIV (Hesseling *et. al.*, 2007).

A vacina BCG provoca primo-infecção artificial, ocasionada por bacilos não-virulentos, com o objetivo de que esta infecção artificial contribua para aumentar a resistência do indivíduo em face de uma infecção ulterior, causada por bacilos virulentos. A vacina BCG brasileira é reconhecida como de alta qualidade pelos laboratórios internacionais. No Brasil, seu uso demonstrou a eficiência da vacinação, com o mínimo de reações indesejáveis, só raramente induzindo complicações sistêmicas e fatais que, quando ocorrem, quase sempre estão associadas com imunossupressão. As contra-indicações do uso desta vacina são: imunodeficiência congênita ou adquirida; neoplasias malignas; indivíduos em tratamento com corticosteróides em dose elevada ou submetidos a outras terapias imunodepressoras (quimioterapia antineoplásica, radioterapia, etc.), e grávidas (WHO, 2008).

Uma série de dados mostra ainda que: (i) o BCG viável foi detectado em pacientes infectados pelo HIV; (ii) o uso desta vacina impede o emprego

subsequente de testes de sensibilidade cutânea para detectar a tuberculose-infecção, interferindo com uma importante ferramenta de diagnóstico em alguns países; (iii) em contraste com o BCG viável, o BCG morto ou antígenos purificados conferem pouca proteção imunológica mesmo quando inoculados em altas concentrações ou juntamente com adjuvantes (OMS, 1995). Por esses motivos tem-se evitado em diversas partes do mundo a utilização do BCG como vacina, neste sentido, uma série de pesquisas estão em desenvolvimento para se encontrar uma vacina substituta. Considera-se que a vacina ideal deva possuir um elevado efeito protetor contra TB e com menor variação de eficácia, superando esta e outras deficiências anteriormente descritas acerca da vacina BCG.

1.2 - RESPOSTA IMUNE AO *Mycobacterium tuberculosis*

O *M. tuberculosis* é um bacilo intracelular aeróbico e tem tropismo pelo tecido pulmonar devido ao aporte de oxigênio. Assim, o bacilo penetra no organismo através das vias respiratórias e dissemina-se pelos órgãos linfáticos ou pelo sangue. A primeira defesa contra o *M. tuberculosis* é a fagocitose realizada pelos macrófagos alveolares, células com potencialidade microbicida capazes de destruir a maioria das bactérias patogênicas. Entretanto, os bacilos possuem habilidade de persistir e de se replicar em microambientes hostis. Uma das estratégias do bacilo inclui a inibição da fusão do endossomo ao lisossomo, inibindo a acidificação (Schlesinger, 1993). A ingestão da

micobactéria induz rápida resposta inflamatória que resulta no acúmulo de uma variedade de células e, com o tempo, a formação de granulomas. A infecção é contida com sucesso, podendo eventualmente calcificar. Contudo, se a resposta imune não for adequada, o granuloma aumenta em tamanho e celularidade. Eventualmente, a célula infectada morre por hipóxia levando a necrose, e a persistência causa destruição tecidual com formação de cavidades no parênquima pulmonar, gerando os sintomas de TB (Riley *et al.*, 1959; Dannenberg & Rook; 1998; Cooper, 2009).

A maioria dos indivíduos desenvolve uma infecção latente, resultando na contenção do bacilo em um ambiente de hipóxia, a qual pode ser reativada em qualquer período da vida, principalmente, sob condições de estresse ou imunossupressão. Os indivíduos com infecção ativa, ao tossir ou espirrar, eliminam os bacilos, que por sua vez, podem permanecer por algum tempo no ambiente, por serem resistentes à dissecação, possibilitando a transmissão da doença a outro indivíduo. Entretanto, o estabelecimento da infecção depende ainda do número de bacilos inalados, da duração da exposição ao bacilo, da virulência da cepa, além das condições imunológicas e características genéticas do indivíduo exposto (Willians, 2006)

Componentes da parede celular das micobactérias, como lipoarabinomanana (LAM), glicolípido fenólico (PGL-I) e proteínas de choque térmico, como a hsp65, também atuam na inibição dos macrófagos. Estes componentes, além de inibirem a ação dos radicais intermediários de oxigênio (ROI), (Cham *et al.*, 1991), diminuem a produção de citocinas inflamatórias (Silva *et al.*, 1993), induzindo a liberação de fatores imunossupressores da resposta imune, como o TGF- β e a IL-10 (Bermudez, 1993).

A interação do patógeno com células dendríticas (DC) e macrófagos é dada inicialmente por uma via inata de reconhecimento, incluindo membros da família de receptores Toll (TLR) (Trinchieri & Sher, 2007), DC-*sign*, receptores de manose, receptores *scavenger* (Ernst, 1998), receptores para a porção Fc de imunoglobulinas, de complemento (CR3) (Schlesinger et.al, 1993), de proteínas surfactantes e CD14. Este é o primeiro passo do encontro da micobactéria com o sistema imune e sua invasão nas células-alvo. A ligação ao receptor de manose também tem sido sugerida como uma possível rota "segura" de entrada para as micobactérias, facilitando sua sobrevivência intracelular (Dheda et. al, 2010).

Os macrófagos infectados com o *M. tuberculosis*, preferencialmente, secretam citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 e IL-6 (Hickman et al. 2002; Dheda et. al., 2010). Estes macrófagos também secretam quimiocinas, como IL-8, RANTES e MCP-1 (revisado por Peters e Ernst, 2003) que ajudam no recrutamento de linfócitos para o sitio de infecção e, conseqüentemente, a formação de granuloma, levando assim, a contenção das micobactérias. Além disso, macrófagos infectados podem secretar IL-10, ao invés de IL-12, o que poderia atuar na supressão das respostas do tipo Th1 (Hickman et al, 2002). A IL-10 também pode inibir a expressão de moléculas do Complexo de Histocompatibilidade Principal II (MHC-II) na superfície da célula, o que, por sua vez, dificulta a respostas de células T CD4 (Belkaid & Tarbell, 2009). A reduzida capacidade dessas células na sinalização e ativação das células T, combinado com o recrutamento de células para a formação do granuloma, pode ajudar na persistência das micobactérias dentro do hospedeiro. Contudo, sabe-se que a estimulação de macrófagos por outros

componentes da resposta imune, tais como IFN- γ ou TNF- α , pode melhorar sua atividade microbicida e está associada com a redução da secreção de IL-10 (Mora & von Andrian, 2006).

A ativação de TLR-2 ou TLR-4 induz a produção inicial de IL-12, moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86) e TNF- α , estimulando os diferentes subtipos de fagócitos (Cooper *et al.*, 1997, Verreck *et al.*, 2009). A citocina IL-12, subsequentemente, leva à produção de IFN- γ pelas células natural killer (NK) na fase inicial da resposta imune (Janeway & Medzhitov, 2002), e tem um papel chave levando à ativação, diferenciação e expansão de células Th1 específicas, que são as principais fontes de IFN- γ durante a resposta imune adaptativa (Abbas *et al.*, 1996; Cooper, 2009).

Os macrófagos têm múltiplos papéis na TB, incluindo processamento e apresentação de antígenos, e também, agindo como células efetoras. Entre as principais funções da ação antimicrobiana dos macrófagos estão produção de enzimas lisossomais, a geração de ROI, a produção de intermediários de nitrogênio (RNI) e a apoptose. A produção de ROI tem importante papel durante a infecção inicial. Contudo, o *M. tuberculosis* desenvolveu estratégias para escapar dos mecanismos por morte oxidativa, como a produção de catalases e superóxido dismutase que degradam os ROI (Cole *et al.*, 1998; Purdy, 2011).

Outro tipo celular de grande importância para a defesa contra o *M. tuberculosis* são as DC, pois participam da geração primária de resposta por células T contra infecção micobacteriana (Zhou & Tedder, 1996; Langenkamp *et al.*, 2000). Elas se originam na medula óssea derivada de precursores tanto mielóide quanto linfóides. As DC são uma população presente na maioria dos

tecidos, como traquéia, pele e intestino, onde sua função é a absorção de antígenos e, após migração para os linfonodos de drenagem, a apresentação do antígeno processado. Possuem a capacidade de absorver os antígenos por algumas rotas, estas incluem a endocitose por clatrina, cavéolas, micropinocitose ou fagocitose, dependendo do estágio de maturação da célula. Altos níveis de expressão do MHC de classe II e de uma série de moléculas co-estimulatórias, que incluem CD80, CD86 e CD40, contribuem para a eficiência das DC como células apresentadoras de antígenos (Banchereau & Steinman, 1998; Harding & Boom, 2010).

As DC infectadas têm habilidade aumentada em ativar células T CD4⁺ *naïve* contra antígenos internalizados. A expressão de moléculas de MHC de classe I é também aumentada após a infecção com BCG ou *M. tuberculosis* (Liu *et al.*, 2000), sugerindo que as DC também têm papel na ativação de células T CD8⁺ contra antígenos peptídicos micobacterianos. Este achado confirma que as DC são as principais células apresentadoras de antígeno (APC) para a geração de resposta específica de células T CD8⁺ contra antígenos micobacterianos, e estas células são ágeis na lise de macrófagos infectados, contribuindo para o controle da infecção (Neumann *et al.*, 2000, Winau *et al.*, 2006).

A resposta imune inata, mediada por DC contra antígenos micobacterianos auxiliam na polarização e diferenciação de células T para os fenótipos Th1 ou Th2. Isto está ligado à capacidade das DC em produzir citocinas como a IL-12 que aumenta a secreção de IFN- γ por células NK e linfócitos T (Demangel & Britton, 2000; Lande *et al.*, 2003).

A resposta específica contra o *M. tuberculosis* envolve células T CD4⁺ e CD8⁺ (Serbina & Flynn, 2001; Serbina *et al.*, 2001, Saunders *et al.*, 2002), bem como células descritas como não convencionais (células T $\gamma\delta$ e TCD1 restritas). Uma segunda via de reconhecimento das frações antigênicas do *M. tuberculosis* é realizada através dos receptores ligados ao MHC II por células T CD4⁺. Estas células têm como função efetora primária a produção de IFN- γ e outras citocinas pró-inflamatórias capazes de ativar macrófagos (Caruso *et al.*, 1999; Boom *et al.*, 2003). As células T CD4⁺ desempenham um papel importante no auxílio às células B e T CD8⁺. É descrito que o IFN- γ é essencial para a proteção contra o bacilo (Flynn *et al.*, 1993), sendo produzido por células T CD4⁺, T CD8⁺ e células NK (Fenton *et al.*, 1997). A importância do IFN- γ é demonstrada pela alta suscetibilidade à infecção micobacteriana observada em pacientes com deficiência de receptores para IFN- γ (Altare *et al.*, 1998). O principal papel do IFN- γ e outras citocinas do tipo Th1 é a resposta anti-micobacteriana pela ativação de macrófagos e propriedade de recrutamento celular (De Libero *et al.*, 1988, Howard & Zwilling, 1998; Cooper, 2009).

As células T CD8⁺ reconhecem peptídeos micobacterianos apresentados através de MHC I e o envolvimento destas células na proteção imune contra a TB é conhecido há algum tempo (Orme *et al.*, 1996, Tan *et al.*, 1997, Lewinsohn *et al.*, 1998). Estas células possuem função citotóxica sobre macrófagos infectados, controlando, dessa forma, a infecção através da liberação de grânulos de perforinas e granzimas e pelo receptor de morte celular Fas-L (Oddo *et al.*, 1998, Boom *et al.*, 2003). Além disso, estas células possuem a capacidade de secretar citocinas, como IFN- γ e IL-4, importantes na

regulação do balanço entre as células Th1 e Th2 nos pulmões de pacientes com TB pulmonar (Stenger *et al.*, 1998; Kauffman, 2006; Cooper 2009).

Outra citocina também importante é o TNF- α , produzida inicialmente por macrófagos em resposta ao estímulo de TLR, mas que também pode ser produzida por células T, B e NK (Flynn *et al.*, 1993, Ehlers, 2003). O TNF- α estimula a expressão de moléculas de adesão, quimiocinas e seus receptores, bem como participa da formação de granulomas nos tecido infectados. Esta citocina também está envolvida na resposta imunopatológica, sendo o principal fator de destruição do tecido pulmonar (Prabha *et al.*, 2003).

A citocina IL-10 é hábil em diminuir a atividade de células T CD4⁺ e T CD8⁺. Além disso, a presença de IL-10 induz a uma diminuição das vias de apresentação de antígenos, com regulação negativa da expressão de moléculas co-estimulatórias, expressas em monócitos e macrófagos (De la Barrera *et al.*, 2004). Sendo assim, a secreção de citocinas antiinflamatórias como a IL-10 por DC e macrófagos é responsável pela infecção e pela ausência de sinais transmitidos por TLR 2 (Jang *et al.*, 2004).

A destruição tecidual na TB não é gerada unicamente pela atividade do bacilo. A natureza imunopatológica é um ponto crucial no entendimento tanto da sobrevivência do hospedeiro quanto da bactéria. O estudo da resposta celular à infecção pelo *M. tuberculosis* é de grande importância para o desenvolvimento de uma nova vacina. A elucidação da interação hospedeiro-patógeno durante a doença é um processo determinante no desenvolvimento de novas opções de tratamento antimicobacteriano. A descoberta de novas estratégias para inibir a patogênese da micobactéria e promover o aumento da

resposta do hospedeiro contra esse microrganismo é fundamental para diminuir a crise global da TB.

1.3 - ESTRATÉGIAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE VACINAS CONTRA A TUBERCULOSE

Um esforço amparado pela OMS chamado *Global Plan to Stop TB* visa promover o desenvolvimento e adoção de novos testes de diagnóstico para a TB, criação de medicamentos e novas vacinas para alcançar a meta de eliminar a doença em longo prazo. Esta eliminação é definida como menos de um caso de TB por milhão de indivíduos (GPS-TB 2011-15). Porém, grandes desafios se colocam no caminho desse objetivo, mas o progresso está sendo feito. Antes do ano 2000 poucos trabalhos estavam sendo realizados visando o desenvolvimento de novas vacinas contra a TB, no entanto, várias estão sendo desenvolvidas, onde atualmente, dez vacinas estão em ensaios clínicos (Kaufmann, 2011) (tabela 1).

A pesquisa para o desenvolvimento de uma nova vacina que tenha uma eficácia modesta, porém mais eficaz do que a atual BCG contra a TB pulmonar no adulto, deverá reduzir significativamente tanto o impacto da saúde quanto os encargos econômicos da doença (Kaufmann, 2011).

Embora o objetivo de introduzir uma nova vacina para TB seja improvável de acontecer nos próximos cinco anos, há razão para se ter otimismo em relação ao eventual sucesso das pesquisas. O fato é que, a

resposta imune orquestrada contra o *M. tuberculosis*, em pessoas saudáveis, protege aproximadamente 90% dos indivíduos infectadas com o bacilo, demonstrando que essa resposta é suficiente para conter a infecção. O completo entendimento desta resposta pode auxiliar na construção de uma nova vacina. Estes indivíduos desenvolvem uma infecção latente caracterizada pelo teste positivo ao PPD, mas sem a progressão da doença ativa (Dye *et. al.*, 1999; Pawlowski *et. al.*, 2012). Contudo, tanto a reativação da infecção latente quanto à reinfeção com o *M. tuberculosis*, após o sucesso de um tratamento, sugere que a resposta imune ao patógeno é complexa e que vacinas contra a TB devam ser desenvolvidas para as diferentes populações considerando o *background* genético dos indivíduos.

As pesquisas em TB na década de 90 foram dirigidas pela revolução genômica e pelos avanços na área da imunologia. O principal progresso no entendimento da patogênese das micobactérias foi através do sequenciamento completo do genoma da *M. tuberculosis* H37Rv por Cole *et al.* (1998) e do desenvolvimento de ferramentas para deleção e troca de genes entre micobactérias (Glickman & Jacobs, 2001). Paralelamente, a tecnologia de genes *knockout* foi fundamental para o discernimento da resposta imune adaptativa na modulação da resposta à TB (Kaufmann, 2001). Estes avanços têm tido impactos diretos no desenvolvimento de novas vacinas.

A partir de dados com experimentação animal, as vacinas têm tido eficácia em induzir a ativação de células T multifuncionais, ou seja, células que podem responder às antígenos específicos através da produção concomitante de vários tipos de citocinas (por exemplo, IFN- γ , IL -2 e TNF- α). Embora o papel da imunidade da mucosa na prevenção da infecção pulmonar ainda é

controverso, várias vacinas têm por objetivo induzir respostas locais após a administração por via aerossol. Portanto, o desenvolvimento de uma nova vacina tem o objetivo de induzir uma potente resposta Th1 com produção de IFN- γ dentro de um contexto de células T multifuncionais, e com uma especificidade dirigida a antígenos com alta capacidade imunogênica (Lambert 2010).

Como as vacinas precisam ser desenvolvidas para recém-nascidos, adolescentes e adultos, cada um destes grupos requer considerações específicas relacionadas com a maturidade do sistema imunológico, e imunidade pré-existente a antígenos micobacterianos (aumentando após a vacinação primária com BCG), incluindo aquela que foi conferida pelas mães aos recém-nascidos. Os ensaios para avaliar a proteção e eficácia de vacinas contra a infecção por *M. tuberculosis* são caros e exigem um aprimorado levantamento clínico em áreas de alta endemicidade do bacilo. Alterações do estado imunológico do indivíduo podem afetar a segurança da vacinação, a proteção induzida pela vacina e a possibilidade de avaliar, posteriormente, a imunidade conferida pela imunização. Como as áreas de alta incidência de TB, na maioria das vezes, são também áreas com altas taxas de infecção pelo HIV-1 (Mansoor *et al.*, 2009), a co-infecção pelo HIV deve ser considerada na escolha de futuras campanhas de vacinação. Da mesma forma, a co-infecção por helmintos, que estimulam a liberação de citocinas do tipo Th2, pode ser considerada como um grande obstáculo, pois altera o *status* imunológico do indivíduo e a sua resposta frente às vacinas contra TB (Tristao-Sa *et al.*, 2002; Elias *et al.*, 2008).

Uma nova vacina contra TB pode ser profilática e/ou terapêutica. A vacina profilática seria ideal pela segurança pré ou pós-exposição ao *M. tuberculosis* e efetiva na prevenção da doença primária, na infecção latente e reativação da infecção latente. A vacina terapêutica seria considerada eficaz em diminuir o curso da infecção ou aumentar a resposta à quimioterapia. (Rowland & McShane, 2010).

Diversas estratégias têm sido utilizadas para a obtenção de novas vacinas contra a TB. Dentre elas, podemos citar o desenvolvimento de vacinas baseadas em microrganismos modificados carregando antígenos autólogos ou heterólogos, de subunidade baseada em antígenos recombinantes ou purificados, e as vacinas de DNA. Algumas vacinas candidatas são baseadas tanto na melhoria da BCG, através da adição de genes relevantes, ou na atenuação de *M. tuberculosis*, através da eliminação de virulência ou outros genes essenciais.

Tabela 1: Vacinas candidatas para o controle da Tuberculose em Fase Clínica

Vacinas	Descrição	Status
Vacinas candidatas a substituírem o BCG ou como Priming		
rBCG30 (UCLA, Aeras)	BCG recombinante que expressa o Ag85B	Fase I completa
rBCGΔUreC:Hly; VPM-1002 (Max Planck Institute, VPM)	BCG recombinante que perfura o endossomo	Fase III
AERAS-422 rBCG (Aeras)	BCG recombinante que perfura o endossomo e expressa os antígenos Ag85A, Ag85B e Rv3407	Fase I
Vacinas candidatas com Boost		
M72 + AS01 (GSK, Aeras)	Proteína de fusão, Mtb 39 + Mtb 32, com adjuvante AS01	Fase III
MVA85A (Oxford, Emergent Biosolutions, Wellcome Trust, Aeras)	Vetor Vaccinia expressando Ag85A	Fase IIB
AERAS-402/Ad35 (Cruceel, Aeras)	Vetor Adenovirus expressando Ag85A, 85B, e 10.4	Fase II/IB
Ad Ag85A (McMaster University)	Vetor Adenovirus expressando Ag85A	Fase I
Hybrid-1 + IC31 (Staten Serum Institut, Intercell)	Proteína recombinante de fusão Ag85B+ESAT-6 com adjuvante IC31	Fase I/ II
Hybrid-1 + CAF01 (Staten Serum Institut)	Proteína recombinante de fusão Ag85B+ESAT-6 com adjuvante CAF01	Fase I
Hybrid-4/AERAS-404 + IC31 (Staten Serum Institut, Sanofi-Pasteur, Intercell, Aeras)	Proteína recombinante de fusão Ag85B+TB10.4 com adjuvante IC31	Fase I

1.3.1 – Vacinas candidatas para o controle da tuberculose

1.3.1.1 Vacinas com micobactéria viva atenuada

A justificativa para o desenvolvimento de vacinas vivas micobacterianas atenuadas é baseada na eficácia já conhecida conferida pela BCG contra as formas graves da doença. Como a BCG induz proteção duradoura contra a TB em algumas regiões, este fato pode ser plausível para reforçar esta proteção com modificações na vacina já existente. Algumas destas vacinas, ditas como recombinantes, já estão em fase clínica e super expressam antígenos imunodominantes. Estas vacinas visam melhorar a indução da resposta de células TCD8 específicas. Uma abordagem alternativa é a utilização de *M. tuberculosis* vivo atenuado, uma vez que o perfil antigênico é diferente da BCG (Rowland & McShane, 2011).

Uma das estratégias para melhorar a eficácia da vacina é a expressão de antígenos, geralmente imunodominantes, do próprio bacilo da TB para a clonagem do BCG, utilizando a engenharia genética. A capacidade de manipular geneticamente a BCG tem permitido o desenvolvimento de linhagens recombinantes que podem ser mais eficazes do que as cepas existentes, e várias estratégias para o desenvolvimento de novas cepas têm sido estudadas nos últimos anos.

Horwitz *et al.* produziram uma cepa BCG (rBCG30) que super expressa o antígeno 85B, uma proteína altamente imunogênica, que, em modelos murinos e cobaias, se mostrou melhor na proteção quando comparada a BCG convencional (Horwitz *et al.*, 2000; Horwitz *et al.*, 2003). O Ag85B é uma

proteína secretada pelo *M. tuberculosis* e pela BCG. Esta possui atividade de micolil-transferase, requerida para a síntese da parede celular das micobactérias (Horwitz *et al.*, 2003). Estudos com o BCG expressando o Ag85B demonstraram a indução de uma resposta protetora em animais quando desafiados, por via aerossol, com *M. tuberculosis* (Horwitz *et al.*, 2000, 2005). Já em fase clínica I, a rBCG30 foi bem tolerada e com uma boa segurança quando comparada a BCG convencional. Houve proliferação de células T específicas para o Ag85B e aumento de IFN- γ nos voluntários estudados (Hoft *et al.*, 2008).

A vacina BCG recombinante AERAS-422 combina duas estratégias importantes através da expressão de perfringolisina O, uma citolisina que é capaz de fazer com que a micobactéria escape do endossomo, e a super expressão de antígenos imunodominantes de *M. tuberculosis* como 85A, 85B e Rv3407 (Sun *et al.*, 2009). Esta BCG recombinante foi segura em camundongos imunodeficientes e a vacinação em camundongos C57BL/6 demonstrou aumento da resposta imune e uma alta sobrevivência nos animais desafiados com *M. tuberculosis*, quando comparados com a vacinação com a BCG parenteral. A fase clínica I em humanos saudáveis é o próximo objetivo do estudo nos EUA (www.aeras.org/portfolio).

Outra estratégia foi realizada pelo grupo do Dr. Kaufmann, onde produziram uma cepa de BCG recombinante (rBCG Δ ureC:hly+) que tem duas características principais: 1) capacidade de secretar listeriolisina, uma citolisina da bactéria *Listeria monocytogenes* que forma poros na membrana dos fagossomos; 2) não tem capacidade de bloquear a acidificação dos fagossomos, como resultado da deleção do gene da urease (Hess *et al.*, 1998;

Grode *et. al.*, 2002). Esta vacina mostrou-se mais eficaz do que a BCG em um modelo murino (Grode *et. al.*, 2005), ressaltando o potencial de uma estratégia que visa inibir a evasão da micobactéria do sistema imune. A fase clínica I, onde se avalia a segurança e imunogenicidade, com esta abordagem vacinal, já foi concluída e a próxima etapa está em curso em estudo na África do Sul. Disponível nos links: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01113281> e <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00749034>

1.3.1.2 Vacinas de subunidades

A possibilidade de se utilizar frações purificadas de antígenos sintéticos, no lugar de microrganismos atenuados, tem contribuído para aumentar a estabilidade e segurança das vacinas. Entretanto, este aumento da segurança vem acompanhado de uma diminuição da capacidade do imunógeno de estimular a resposta imune efetiva. Uma alternativa para minimizar tal problema seria a utilização de adjuvantes (Bomford, 1989).

A identificação e caracterização do filtrado de cultura de *M. tuberculosis* no início dos anos 90 e da constatação de que alguns desses antígenos são altamente imunogênicos, foi fundamental para a testagem de vacinas baseadas em proteínas. A justificativa para o desenvolvimento de uma vacina de subunidade para a TB é a indução de uma resposta do tipo Th1 contra antígenos que são secretados pela micobactéria nas etapas iniciais da infecção, resultando numa rápida e eficaz mobilização de células T no local, podendo, com isso, conter a infecção e reduzir o risco do desenvolvimento da tuberculose ativa. Os trabalhos iniciais de Pal & Horwitz (1992) mostraram que

era possível induzir, em camundongos, uma resposta antígeno-específica que poderia controlar parcialmente o crescimento da bactéria *in vivo*. Esses achados foram melhorados após a conclusão da sequência do genoma do *M. tuberculosis*, com a identificação de mais antígenos imunogênicos (Cole *et al.*, 1998).

Na última década, vários destes antígenos foram identificados. Entre os mais importantes estão os antígenos ESAT-6 e CFP10, que são codificados pela região RD1, além dos antígenos 85B e MPT64 (Delogu & Fadda, 2009). Estas vacinas são designadas, muitas vezes, para impulsionar a resposta induzida pela BCG, primariamente, possibilitando respostas específicas ao *M.tuberculosis*. Todas as atuais vacinas candidatas protegeram camundongos e cobaios quando comparados com a BCG. Várias têm se mostrado também serem protetoras em primatas não humanos (Langermans *et. al.*, 2005; Verreck *et. al.*, 2009).

Para aumentar a capacidade de produção em larga escala de múltiplos antígenos imunodominantes, diferentes vetores estão sendo testados, como os vetores virais poxvírus, adenovírus e o vírus modificado vaccínia Ankara (MVA). A vacina MVA85A é uma vacina de subunidade com vetor viral MVA carreando o antígeno micobacteriano 85A (Mcshane *et. al.*, 2001). Esta vacina tem sido avaliada em fase clínica I em adultos saudáveis na Inglaterra desde 2002, incluindo indivíduos vacinados com a BCG e aqueles com tuberculose latente (Mcshane *et. al.*, 2004; Sander *et. al.*, 2009). Estes dados prévios levaram a vacina à fase clínica II em população da África do Sul, Gâmbia e Senegal, demonstrando sua segurança na administração em populações de

alto risco, como adultos infectados com o HIV, coinfectados TB/HIV e crianças (Brookes *et. al.*, 2008; Scriba *et. al.*, 2010).

Outra vacina de subunidade que utiliza um vetor viral (adenovírus tipo 35- Ad35 não replicante) é a AERAS-402. Esta vacina é capaz de expressar uma proteína de fusão com os antígenos 85A, 85B e TB10.4. A vacina AERAS-402 foi capaz de induzir proteção em camundongos desafiados com *M. tuberculosis*, através da produção de células TCD4 e TCD8 produtoras de IFN- γ , imunizados tanto por via intramuscular quanto por via intranasal (Radosevic *et. al.*, 2007). Durante o ensaio clínico de fase I, a vacina AERAS-402 induziu células TCD4 multifuncionais e produção de IFN- γ por células TCD8 em resposta ao estímulo com os antígenos vacinais (Abel *et. al.*, 2010). Esta vacina está atualmente em fase clínica II, sendo testada em adultos vacinados com BCG, HIV positivos e crianças. Informações disponíveis no link abaixo:

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01017536>

A vacina Ad5Ag85A consiste em expressar o Ag85A em adenovírus do tipo 5 não replicante. Foi demonstrado em modelo murino e cobaios que a administração da vacina Ad5Ag85A por via intranasal, mas não intramuscular, foi capaz de proteger melhor estes animais do que a BCG, e ainda, sua capacidade protetora foi aumentada quando administrada após uma prévia imunização com a BCG (Wang *et. al.*, 2004; Xing *et. al.*, 2009). Esta vacina está em fase clínica I, no entanto, a utilização de Ad5 como vetor está sendo amplamente questionado (Lasaro *et. al.*, 2009). Este fato incide devido a um estudo para uma nova vacina contra HIV utilizando Ad5 como vetor, sugerindo uma tendência de aumento da infecção com o HIV em indivíduos com anticorpos circulantes anti-Ad5 antes da vacinação (Buchbinder *et. al.*, 2008).

Além da utilização de vetores vivos, as vacinas de subunidade podem ser desenvolvidas com adição de adjuvantes, aumentando, assim, a resposta imune celular. A vacina M72 consiste na formulação de uma poliproteína do *M. tuberculosis* 72-KDa (fusão de duas proteínas: Mtb32 e Mtb39) com o adjuvante ASO2A (Skeiky *et. al.*, 2004). A M72, administrada após vacinação com a BCG, demonstrou ser eficaz no aumento da sobrevivência de cobaias e primatas não-humanos (Brandt *et. al.*, 2004; Reed *et. al.*, 2009). A vacinação foi bem tolerada em fase clínica I em indivíduos adultos saudáveis, induzindo uma resposta antígeno-específica de células TCD4 com a produção de IFN- γ e IL-2 (Von Eschen *et. al.*, 2009).

Igualmente em fase clínica I está a vacina Hybrid-1 baseada na fusão de proteínas imunodominantes como o Ag85B e ESAT-6 (Weinrich Olsen *et. al.*, 2001). A vacinação com Hybrid-1 e o adjuvante IC31 evidenciou uma resposta protetora contra o desafio com o *M. tuberculosis* em camundongos e cobaias, tanto neonatos quanto em animais adultos (Kamath *et al.* , 2008). A primeira avaliação em ensaio clínico de fase I em adultos saudáveis foi associada à sensibilidade local transitória e resposta de células T antígeno-específicas. A resposta de células T foi mantida por pelo menos dois anos (Van Dissel *et. al.*, 2010). A vacina Hybrid 1 também foi formulada com um novo adjuvante CAF01 (formulação de adjuvante catiônico), resultando em uma resposta durável, com formação de células Th1 multifuncionais e proteção contra o *M. tuberculosis* em camundongos (Kamath *et. al.*, 2009).

1.3.1.3 Vacinas de DNA

A vacina de DNA consiste de um plasmídeo bacteriano, isto é, um pequeno DNA circular capaz de se replicar em bactérias, contendo sequências que codificam uma proteína antigênica e servindo como vetor para a mesma. Os plasmídeos utilizados como vacina de DNA possuem ainda outras sequências, necessárias para a seleção e replicação em bactérias, além de sequências específicas que permitem a expressão gênica em células procarióticas e eucarióticas (Lima *et al.*, 2001).

A imunização gênica emergiu há mais de dez anos atrás, como uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novas vacinas contra diversos agentes infecciosos. Comparada com as vacinas de subunidade, a produção e purificação de vacinas de DNA em geral possuem um custo menor. As vacinas de DNA são também simples no seu desenvolvimento e, por estas razões, têm sido utilizadas como modelo para teste de atividade protetora e imunogenicidade aos antígenos de *M. tuberculosis*. Os antígenos que estão sendo testados são, principalmente, as proteínas imunogênicas como ESAT-6, MPT64, Ag85A/B, e MPT83, porém, outros antígenos têm promovido resultados significantes como HSP-65 (Silva & Lowrie, 1994; Tascon *et al.*, 1996; Silva, 1999) e KATG (Li *et al.*, 1999). A vacinação em camundongos com vacina de DNA promoveu aumento significativo da resposta imune mediada por células com um mais amplo repertório de células T quando comparadas com vacinas de subunidade (Denis *et al.*, 1998). A vacinação com DNA forneceu proteção mesmo em camundongos com deficiência de células TCD4 (Derrick *et al.*, 2004), sugerindo a possibilidade de imunização em

indivíduos infectados com HIV, que possuem maior risco de desenvolver a TB ativa.

O principal obstáculo das vacinas de DNA está em face da sua baixa imunogenicidade gerada em modelo animal maior, como primatas não-humanos (Ulmer *et. al.*, 2006), provavelmente, resultado da baixa transfecção dos plasmídeos *in vivo*. Para tentar resolver esse problema, o uso da eletroporação *in vivo* tem sido introduzido nos testes em animais e humanos (van Drunen Littel-van den Hurk & Hannaman, 2010; Sardesai & Weiner, 201), além de formulações como o seu encapsulamento em microesferas poliméricas biodegradáveis. Os resultados demonstraram que o DNA pode ser encapsulado nas microesferas de ácido poli-lático e glicólico (PLGA) sem o comprometimento da sua funcionalidade. Os estudos *in vitro* demonstraram que células fagocitárias capturam as microesferas de PLGA, que por sua vez liberam o DNA encapsulado, o qual dirige a síntese da proteína antigênica, aumentando, assim, a imunogenicidade das vacinas de DNA (Lima, 2001; Lima *et. al.*, 2003).

1.3.1.4 Vacina DNA-heat shock protein 65kDa (DNA-hsp65)

As proteínas de choque térmico (HSP) são moléculas com alto grau de conservação entre as espécies, desempenhando importantes funções biológicas tais como dobramento e translocação de proteínas, além da montagem de complexos protéicos, sendo por isto, chamadas de chaperonas. A síntese de HSP é aumentada para proteger células procariotas e eucariotas

de possíveis danos durante períodos de estresse causados por infecções, inflamações ou eventos similares (Zugel & Kaufmann, 1999). A HSP está entre os antígenos que mais frequentemente são reconhecidos na resposta imune a patógenos intracelulares, incluindo as micobactérias, refletindo uma particular habilidade deste antígeno em se associar ao MHC (Kaufmann, 1990). Além disso, essas proteínas têm sido descritas como fator de virulência de diversos microrganismos (Lewthawaite *et. al.*, 1998). Diferentes epítomos das moléculas da HSP foram descritos em *M. tuberculosis* e *M. leprae* (Mustafa *et. al.*, 1996, 1999), porém a proteína HSP65 é um antígeno imunodominante (Kaufmann *et. al.*, 1987)

O passo inicial no processo de vacinação com esta formulação foi dado utilizando um vetor retroviral que carregava o gene que codifica o antígeno *hsp65* de *M. leprae*. Células da linhagem tumoral J774 foram produzidas através da transferência de macrófagos de camundongos BALB/c, e estas células apresentadoras de antígeno produzem endogenamente HSP65 em forma estável (*J774-hsp65*). Foi demonstrado que o antígeno micobacteriano HSP65 foi apresentado na superfície de células transfectadas *J774-hsp65* em associação com moléculas de MHC de classe I e II para o reconhecimento específico por células T dos três tipos principais, CD4, CD8 e TCR γ/δ (Silva *et al.*, 1993, Silva *et al.*, 1992). Quando camundongos BALB/c foram submetidos a uma série de injeções intraperitoneais ou intravenosas (ip ou iv respectivamente) de células transfectadas (*J774-hsp65*), eles adquiriram um alto grau de proteção contra subsequente desafio ip ou iv de infecção com cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv, e o número de bactérias declinou exponencialmente depois de cinco semanas em órgãos internos,

principalmente no fígado, comparados com animais controle. Injeção da proteína pura com adjuvante não foi eficiente (Silva & Lowrie, 1994, Siva *et al.*, 1994).

A análise da resposta imune ao DNA expressando HSP65, por ELISA e RT-PCR em tecidos, e antígenos estimulando células T, evidenciou uma resposta predominantemente do tipo Th1 (IFN- γ abundante e níveis mínimos de IL-4). Células TCD8⁺ citolíticas (CTL) responderam a peptídeos com epítomos de *hsp65* apresentados por MHC de classe I (Lowrie *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 1996; Lowrie *et al.*, 1997a; Lowrie *et al.*, 1997b; Lowrie *et al.*, 1997c). A frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ e o nível de proteção declinou oito meses depois da transferência de células J774-*hsp65* ou imunização mediada por lipossomos com a proteína HSP65, porém, foi sustentada ou aumentada durante este período depois da imunização com DNA-*hsp65* (Silva *et al.*, 1996; Lowrie *et al.*, 1997a; Bonato *et al.*, 1998; Lowrie *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 1999).

A surpreendente diferença entre a resposta imune à vacinação com DNA e a resposta ao BCG ou infecção por *M. tuberculosis*, é que a vacina de DNA induziu quase que totalmente a proteção por resposta de citocinas do tipo Th1, e a infecção micobacteriana elicitou um componente principal de células não citotóxicas, com resposta baseadas em citocinas do tipo Th2 (Silva *et al.*, 1996, Bonato *et al.*, 1998, Silva *et al.*, 1999).

A fim de melhorar a capacidade imunogênica da formulação, utilizou-se como estratégia a combinação de adjuvantes com propriedades imunoestimulantes e carreadoras, empregando a tecnologia de microencapsulação. Foi elaborada uma nova formulação contendo a vacina de DNA-*hsp65* e um composto imunoestimulante, o dimicolato de trealose (DMT),

ambos encapsulados em microesferas biodegradáveis (Lima *et. al.*, 2001). Esta formulação composta por microesferas contendo DMT e DNA-hsp65 foi capaz de estimular a resposta imune protetora após uma única administração, enquanto que a injeção intramuscular do DNA nu requer três doses para conferir a mesma proteção. Esta vacina baseada em microesferas permitiu ainda a redução da dose de plasmídeo em dez vezes quando comparada àquela com DNA nu (Lima *et al*, 2003).

Os estudos com a utilização da vacina DNA-hsp65, em animais previamente infectados com o *M. tuberculosis* virulento, não só previne o desenvolvimento da doença como também elimina a infecção. Este fato torna-se realmente relevante quando se considera que cerca de dois bilhões de pessoas já estão infectadas pelo bacilo da TB. Além disso, a vacina se mostrou com propriedade de cura mesmo quando administrada em estados mais avançados da doença ou após sua disseminação por todo o organismo do animal, pois permitiu uma mudança profunda na resposta imunológica, passando do padrão de Th2 para o Th1, criando condições para a cura da doença, mesmo sem a administração de quimioterápicos antimicobacterianos (Bonato *et.al.*, 1998; Lowrie *et. al*, 1999).

Mais recentemente, foi demonstrada que a combinação de microesferas mais microesferas carreando a proteína HSP65, em protocolo heterólogo *prime-boost*, foi hábil em gerar resposta imune protetora e de longa duração (Ruberti *et. al.*, 2004). Além disso, houve a proteção contra a TB, em camundongos, através da administração intranasal da vacina DNA-hsp65 com lipossomos catiônicos (Rosada *et. al.*, 2008; Souza *et. al.*, 2008).

Atualmente, a utilização da vacina de DNA, que codifica a proteína HSP65, foi considerada hábil em estimular células B e proteger camundongos desafiados com o *M. tuberculosis*, demonstrando a participação efetiva destas células na apresentação de antígenos e na ativação de células TCD8 (Almeida *et. al*, 2011).

Os benefícios práticos e estratégicos resultantes do desenvolvimento de vacinas gênicas são inúmeros e absolutamente desejáveis no contexto dos problemas de saúde pública, principalmente, em países em desenvolvimento. O impacto sobre o controle das doenças infecciosas que podem ser prevenidas por imunização gênica será, provavelmente, uma das aquisições mais importantes advindas do domínio desta nova tecnologia (Rodrigues Junior *et. al*, 2004).

1.4 – O USO DA ELETROPORAÇÃO EM VACINAS

Um dos métodos aplicados recentemente em vacinas é a eletroporação, um método tradicionalmente utilizado para aumentar a eficiência da transfecção de células *in vitro*, tem sido agora estudado para induzir a absorção e a expressão das vacinas compostas por plasmídeos *in vivo* (Widera *et al.*, 2000; Prud'homme *et al.*, 2007) e, em consequente, induzir uma resposta imunológica de longa duração, como visto em tumores induzidos em modelo animal (Ugen *et al.*, 2006). A aplicação de pulsos elétricos de baixa tensão no tecido muscular pode aumentar a permeabilidade celular e facilitar a captação

dos nucleotídeos para dentro das células (Mathiesen,1999; Widera *et al.*, 2000).

Recentemente, a eletroporação tem sido aplicada em vacinas de DNA para o estudo de HIV-1 em primatas não-humanos, obtendo-se resultados animadores (Otten *et al.*, 2004 e 2006; Luckay *et al.*, 2007; Rosati *et al.*, 2008; Simon *et al.*, 2008). Em 2004, Otten *et al.* evidenciaram o aumento da produção de anticorpos contra as proteínas Gag e Env, além do aumento da resposta mediada por células em macacos rhesus imunizados com uma vacina de DNA contra o HIV, utilizando a eletroporação, demonstrando a utilidade deste método para uso em animais maiores. Estudo realizado por Luckay *et al.* (2007) demonstrou que a combinação de dois métodos vacinais, pela via intramuscular e por eletroporação, induziram uma resposta imune mais rápida e específica em rhesus, observando aumento de 10 a 40 vezes na resposta HIV-específica comparados aos animais que receberam uma dose cinco vezes maior da vacina sem a utilização de eletroporação. Da mesma forma, Hirao *et al.* (2008) demonstraram que, após uma única imunização da vacina pGag4Y/pEY2E1-B por eletroporação em macacos rhesus, os níveis de IFN- γ foram semelhantes ao observado após três imunizações da mesma vacina por via intramuscular. Segundo Rosati *et al.* (2008), a imunização com o plasmídeo MCP3-p37gag por eletroporação em macacos rhesus levou a expansão de células de memória central e efetora TCD4 e TCD8 antígeno específicas, indicando que a eletroporação aumenta a imunogenicidade de vacinas de DNA, sendo um método importante para melhorar a eficácia destas vacinas.

Contudo, estudos em primatas não-humanos envolvendo esta via de administração para uma nova construção vacinal para o controle da TB são

escassos. Li *et al.* (2006), apontam que a imunização de macacos rhesus com a vacina DNA-Ag85A ou DNA-ESAT-6 aumentou a produção de anticorpos específicos, tanto por via intramuscular quanto por eletroporação, no entanto, a imunização por eletroporação empregou uma menor concentração de DNA.

Níveis de anticorpos diferentes foram encontrados após o reforço com as proteínas Ag85A ou ESAT-6, onde no grupo que não recebeu eletroporação houve um aumento de 3 a 4 vezes nos níveis de anticorpos específicos, enquanto que no grupo que recebeu eletroporação houve um aumento de 7 a 8 vezes, indicando que a eletroporação, além de utilizar concentrações inferiores de DNA, pode possuir um efeito adicional sobre a resposta imune, atuando como adjuvante pelo recrutamento de células mononucleares para o sítio de imunização, como já visto anteriormente por Gronevik *et al.* (2003).

1.5 - IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DOS EVENTOS ADVERSOS NO DESENVOLVIMENTO DE VACINAS

Os eventos adversos que podem ser imputados às vacinações são apenas uma fração dos eventos que realmente ocorrem após as vacinações. Muitos desses eventos são doenças intercorrentes que ocorrem em associação temporal com a vacinação. O aumento da frequência ou intensidade habitual destes eventos deve-se levar a uma apurada investigação. Os eventos adversos podem ser os esperados, tendo em vista a natureza e as características do imunobiológico, bem como o conhecimento já disponível pela experiência acumulada, ou inesperados. Entre os eventos esperados, podemos

ter eventos relativamente triviais, como febre, dor e edema local, ou eventos mais graves, como convulsões febris, episódio hipotônico-hiporresponsivo, choque anafilático entre outros (Ministério da Saúde – MS/Brasil, 2008).

Por estes motivos, busca-se obter vacinas cada vez mais eficazes e menos reatogênicas. Vale ressaltar que o desenvolvimento de uma nova vacina é extremamente laborioso, objetivando o maior grau possível de proteção (eficácia) com o menor número possível de eventos adversos (inocuidade). Este processo costuma levar oito anos ou mais, para cumprir as três fases recomendadas pela OMS, como se pode ver na figura 1.

Etapa	Ensaos pré-clínicos		Fase I	Fase II		Fase III		
	1	2	3	4	5	6	7	8
População	Animais de laboratório		10 a 100 voluntários	100 a 300 voluntários		1.000 ou mais voluntários sãos		
Objetivo	Ensaos de segurança e atividade biológica		Determinação de segurança e dosificação	Avaliação de efetividade e efeitos secundários		Verificação de efetividade e monitoração das reações adversas		

Figura 1: Ministério da Saúde – Brasil 2008. Manual de vigilância epidemiológica de eventos adversos pós-vacinação.

Para assegurar a segurança e a ausência de eventos adversos decorrentes da vacinação, é indispensável uma criteriosa avaliação clínica e laboratorial em ensaios pré-clínicos e clínicos, para a busca rigorosa do diagnóstico etiológico, com a finalidade de que o evento adverso, a sequela ou mesmo o óbito não sejam atribuídos à vacina, sem fundamentação científica.

O órgão governamental dos EUA *Food and Drug Administration* (FDA) faz considerações para o desenvolvimento de estudos relativos à segurança e imunogenicidade na formulação de vacinas preventivas e terapêuticas e de estudos concernentes à toxicidade, tanto local quando sistêmica provocada por vacinas de DNA plasmidial. Estas diretrizes estão dispostas em manuais e

dentre as considerações apontadas em ensaios pré-clínicos estão: monitoramento do bem-estar animal; avaliações de exames de patologia clínica (hematológicos, parâmetros bioquímicos e testes de coagulação) e histopatologia, englobando tanto análises macro quanto microscópica dos tecidos (*Center for Biologics Evaluation and Research – CBER, 2006 e 2007; Chang et. al., 2007*). Além disso, o MS/Brasil (2008) lista as lesões locais e regionais mais frequentes relacionadas à vacinação com a BCG, e estas servem como parâmetros para comparação com novas vacinas candidatas ao controle da TB. Dentre as lesões que devem ser observadas estão: úlcera com diâmetro maior que 1cm; abscessos subcutâneo; linfadenopatia regional supurada; cicatriz quelóide e reação lupóide.

De um modo geral, as vacinas figuram entre os produtos biológicos mais seguros para o uso humano, proporcionando benefícios indiscutíveis à saúde pública. No entanto, como qualquer outro produto farmacêutico, elas não estão isentas de risco. Por tanto, estudos pré-clínicos e clínicos que visam assegurar a segurança de uma nova vacina vem de encontro a permitir que os benefícios alcançados com a utilização das mesmas sejam sempre superiores os seus possíveis riscos.

1.6- ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS PARA DESENVOLVIMENTOS DE VACINAS CONTRA TUBERCULOSE EM MODELO ANIMAL

Estudos pré-clínicos de vacinas candidatas são amplamente baseados na experimentação em modelos animais. Embora existam modelos adequados para avaliar a segurança e imunogenicidade de novas vacinas, o principal desafio é estimar a capacidade de proteção das vacinas candidatas. A primeira abordagem é selecionar candidatos para o desafio em modelos murino, em seguida, os cobaios desafiados através de via de aerosol e, finalmente, efetuar os estudos de desafio em primatas não humanos (McMurray, 1994; Walsh *et. al*, 1996). A princípio, é no último modelo que se espera uma melhor reflexão em relação de como a vacina candidata agiria no humano em relação à imunogenicidade e à suscetibilidade a doença. No entanto, quantidades limitadas de primatas não humanos estão disponíveis para os estudos, além disso, a diversidade genética e as questões éticas podem dificultar.

O trabalho pioneiro que definiu o padrão da doença em camundongos foi realizado por Browning & Gulbransen (1926), porém somente na década de 40, quando a primeira quimioterapia para TB estava em desenvolvimento, os pesquisadores perceberam a importância deste modelo, principalmente quanto ao custo e quanto à importância na avaliação de drogas (McKee *et al.*, 1949; Raleigh & Youmans, 1949). Durante as três últimas décadas, importantes informações sobre modelos murinos tornaram-se disponíveis, o que ajudou a construir o conceito de imunidade adquirida na TB (Mackness, 1968; Orme *et al.*, 1993). Portanto, é reconhecida uma série de vantagens na utilização de

camundongos para TB, tal como a maioria dos humanos, estes animais são capazes de gerar uma forte resposta imunológica ao *M. tuberculosis*, e geralmente, são resistentes às baixas doses do inóculo, podendo conter a infecção sem o desenvolvimento da doença. É um modelo extremamente atrativo por várias razões, incluindo; o baixo custo comparado a outros animais; a contenção e o manuseio relativamente fácil; a disponibilidade na obtenção de reagentes; a reprodução da infecção; e a susceptibilidade através de animais isogênicos e geneticamente modificados (Cooper *et al.*, 1993). Contudo, dados na literatura descrevem diferenças nos aspectos da infecção nestes animais que não se assemelham à doença humana, incluindo a reativação espontânea (Grupta & Katoch, 2005), além do fato de tais animais não exibirem a reação granulomatosa, típica nos pulmões, representando desvantagem como modelo animal para a TB (Rhoades *et al.* 1997).

Tanto cobaias quanto coelhos têm sido usados na pesquisa em TB, já que estes animais mimetizam algumas características da doença humana, incluindo granulomas pulmonares (que estão mais associados à patologia da TB em humanos) e a formação de cavidades (revisto por McMurray, 2001). O mais completo estudo em TB utilizando o coelho como modelo experimental foi realizado por Lurie (1932) e Lurie & Dannenberg (1965), e para estes estudos, foi desenvolvido uma linhagem isogênica resistente e uma suscetível à TB. Os coelhos resistentes desenvolveram cavitação, enquanto os animais susceptíveis desenvolveram TB disseminada, assim como o encontrado em seres humanos imunocompetentes e imunocomprometidos, respectivamente. Deste modo, esta espécie animal proporciona um excelente modelo para o estudo da TB, uma vez que apresenta um aspecto da doença semelhante à

doença humana (Canetti, 1955; Dannenberg, 1998). Porém, o estudo da resposta imune nestes animais é dificultado por não haver reagentes apropriados, e pela dificuldade em obter animais isogênicos, estes estão indisponíveis para as pesquisas na atualidade (Gupta & Katoch, 2005).

Primates não-humanos, principalmente aqueles do gênero *Macaca*, possuem muitas vantagens no seu uso como modelo experimental na avaliação da TB, pela similaridade com humanos (revisado por McMurray, 2000), e estão sendo utilizados como modelos para testar eficácia de vários protótipos vacinais. É sugerido que estes animais sejam os mais susceptíveis à TB entre os animais em cativeiro, sendo a doença rara entre primatas não-humanos selvagens. A mortalidade varia até mais de 10% ao ano e parece ser particularmente mais devastadora entre espécies do Velho Mundo, comparados com as do Novo Mundo (O'Reilly & Daborn, 1995). Um estudo realizado por Walsh *et al.* (1996) reportou que macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) são mais resistente à infecção pelo *M. tuberculosis* comparado aos macacos rhesus (*Macaca mulatta*). Neste estudo, foi observado que os cynomolgus desenvolveram uma doença crônica, progressiva e/ou granulomatosa, quando infectados com 10 a 100 bacilos pela via intratraqueal; enquanto que os rhesus desafiados com uma menor dose sucumbem à doença aproximadamente de 6 a 12 semanas após a infecção. Da mesma forma, Capuano *et al.* (2003) utilizando baixas doses da cepa virulenta Erdman de *M. tuberculosis*, observaram que em cynomolgus a infecção crônica ativa estava presente em 50-60%, e cerca de 40% não apresentaram progressão da doença, concluindo que baixa dose infectante é capaz de induzir todas as formas clínicas da TB, como as descritas no homem; pois os animais

apresentaram doença fulminante, doença crônica ou a TB latente. Estudos subsequentes reforçaram a idéia de que os macacos *cynomolgus* são modelos apropriados para o estudo da infecção e reativação por *M. tuberculosis* (Langermanas *et al.*, 2001; Fuller *et al.*, 2003, Kita *et al.* 2005).

A avaliação de novas vacinas para utilização na clínica humana, passa pela necessidade de se testá-las ainda em fase pré-clínica, em modelo animal que desenvolva e reproduza a doença humana em questão. Embora tenhamos tido progressos significativos no sentido de uma melhor compreensão do mecanismo profilático das vacinas de DNA, a elucidação dos eventos adversos e da imunogenicidade subjacentes a imunização com vacina de DNA por eletroporação em primatas não-humanos ainda não foi estudada. Neste estudo, foram avaliados aspectos referentes à segurança do método de eletroporação e a imunogenicidade da vacina pVax-hsp65 em macacos *cynomolgus*, elucidando a forma como este protótipo vacinal atua neste modelo animal. Deste modo, a explanação destes aspectos é muito importante para a compreensão desta nova estratégia vacinal em animais filogeneticamente próximos ao homem.

2-Objetivos

2 – OBJETIVOS

Avaliar em primatas não-humanos (macacos cynomolgus) a segurança e a imunogenicidade do protótipo vacinal contendo pVAX-hsp65 empregando como sistema de liberação a eletroporação .

Os objetivos específicos foram:

- 1- Avaliar os eventos adversos após a vacinação com pVAX-hsp65 por eletroporação em macacos cynomolgus;
- 2- Avaliar se a vacinação com pVAX-hsp65 por eletroporação em macacos cynomolgus induz conversão ao teste tuberculínico;
- 3- Avaliar a indução da resposta imune celular através da expressão de marcadores de ativação celular e de memória, induzidas em macacos cynomolgus vacinados com pVAX-hsp65 por eletroporação;
- 4- Avaliar a indução de citocinas do tipo Th1 (IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-6) e Th2 (IL-10, IL-4 e IL-5) induzidas em macacos cynomolgus vacinados com pVAX-hsp65 por eletroporação.

3-Materiais e Métodos

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Foram disponibilizados 21 primatas não-humanos machos da espécie *Macaca fascicularis* (macacos cynomolgus) sendo considerados adultos jovens, pelo Serviço de Primatologia do Centro de Criação de Animais de Laboratório (Cecal), Fiocruz.

Para a seleção dos animais foram realizados exames clínicos (dados morfométricos, peso e idade) e laboratoriais (hematológicos, bioquímicos, parasitológicos e sorológicos) e teste cutâneo à tuberculina.

Os exames sorológicos para diversas doenças infecto-parasitárias tais como CMV (citomegalovírus), rubéola, toxoplasmose, hepatite B e doença de Chagas, foram realizados pela técnica de ELISA. Valores dos *cutoffs* para IgM e IgG específicos para CMV, rubéola e toxoplasmose, foram considerados positivos ≥ 6 unidades arbitrárias (UA) por mL e resultados negativos menores que 4UA/mL. Para a doença de Chagas, foram utilizados testes de ELISA, onde os resultados foram considerados positivos quando os valores do *cutoff* foram $>0,190$, considerando-se zona cinza valores entre 0,190 e 0,229; e por imunofluorescência indireta (IFI), para anticorpos IgG anti-*Trypanosoma cruzi*.

Testes para hepatite B foram realizados por ELISA e foram considerados positivos os valores de *cutoff* superiores a 0,068 para HBsAg e 0,290 para anti-HBS. A presença de fator anti-nuclear (FAN) foi também identificado nos animais. Estes exames foram realizados no Setor de Imunodiagnóstico do Ipec-Fiocruz, utilizando-se kits comerciais para uso humano.

Os exames laboratoriais foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica e Laboratório de Parasitologia do IPEC-Fiocruz, como descritos no item 3.7. O teste tuberculínico foi realizado como descrito no item 3.9.

Ao final destes testes, todos os animais mostraram-se negativos ao teste tuberculínico e a sorologia, com exceção para IgG para CMV. A escolha para os 12 animais incluídos foi feito pelos exames laboratoriais e pelo peso. A tabela 2 apresenta os resultados dos exames sorológicos e as setas indicam os animais selecionados para o estudo.

Este estudo faz parte do projeto “Imunogenicidade e efeitos colaterais da vacina DNA-*hsp65* em primatas não humanos (*Macaca fascicularis*)”, no qual foi encaminhado para avaliação e licenciamento da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-Fiocruz), obtendo a licença sob o protocolo: P0184-03.

Tabela 2: Triagem sorológica dos macacos cynomolgus disponibilizados pelo Cecal, 12 destes animais foram selecionados para o projeto.

ANIMAIS	CMV IgG	CMV IgM	RUB IgG	RUB IgM	Toxo IgG	Toxo IgM	Chagas EIE	Chagas IFI	HBsAg	anti-HBs
	pos ≥ 6 UA/ml neg < 4 UA/ml	pos ≥ 6 UA/ml neg < 4 UA/ml	pos ≥ 6 UA/ml neg < 4 UA/ml	pos ≥ 6 UA/ml neg < 4 UA/ml	pos ≥ 6 UA/ml neg < 4 UA/ml	pos ≥ 6 UA/ml neg < 4 UA/ml	CO= 0,190 ZC= 0,229	-	CO= 0,068*	CO= 0,290*
➔P7	(+) 9	(-) 0,06	(-) 0	nr	(-) 0	nr	(-) 0,054	(-)	(-) 0,020	(-) 0,116
➔M7	(+) 6	(-) 0,07	(-) 0	nr	(-) 0	(-) 0,07	(-) 0,077	(-)	(-) 0,017	(-) 0,110
➔J1	(+) 6	(-) 0,06	(-) 0	nr	(-) 0	nr	(-) 0,097	(-)	(-) 0,020	(-) 0,121
➔M5	Indeterm. 5	(-) 0,03	(-) 0	nr	(-) 0	nr	(-) 0,053	(-)	(-) 0,013	(-) 0,111
P3	(+) 12	(-) 0,04	(-) 0	nr	(-) 0	nr	(-) 0,125	(-)	(-) 0,017	(-) 0,103
➔O9	(+) 14	(-) 0,04	(-) 0	nr	(-) 0	nr	(-) 0,081	(-)	(-) 0,013	(-) 0,153
Q3	(-) < 4	nr	(-) 0	nr	(-) 0	nr	(-) 0,065	(-)	(-) 0,019	(-) 0,117
➔Q9	(+) 11	(-) 0,05	(-) 0	nr	(-) 0	nr	(-) 0,140	(-)	(-) 0,014	(-) 0,086
➔M1	(-) < 4	nr	(-) 0	nr	(-) 0	nr	(-) 0,051	(-)	(-) 0,018	(-) 0,124
O1	(-) 0,66	(-) 0,118	(-) 0	(-) 0,08	(+) 15,63	(-) 0,030	(-) 0,041	(-)	(-) 0,041	(-) 0
➔N3	(+) 7	(-) 0,07	(-) 0	nr	(-) 0	(-) 0,07	(-) 0,085	(-)	(-) 0,015	(-) 0,123
L7	(-) 0,28	(-) 0,129	(-) 0	(-) 0,09	(+) 93,57	(-) 0,169	(-) 0,046	(-)	(-) 0,033	(-) 0
J3	(-) 0	(-) 0,121	(-) 0	(-) 0,09	(+) 2,676	(-) 0,102	(-) 0,043	(-)	(-) 0,029	(-) 0
➔L9	(+) 13	(-) 0,06	(-) 0	nr	(-) 0	nr	(-) 0,072	(-)	(-) 0,017	(-) 0,141
I3	(+) 8	(-) 0,04	(-) 0	nr	(-) 0	nr	(-) 0,057	(-)	(-) 0,031	(-) 0,119
D1	(+) 12	(-) 0,07	(-) 0	nr	(-) 0	nr	(-) 0,043	(-)	(-) 0,022	(-) 0,089
➔H3	(+) 17	(-) 0,05	(-) 0	nr	(-) 3	(-) 0,08	(-) 0,047	(-)	(-) 0,020	(-) 0,118
1	(+) 12	(-) 0,05	(-) 0	nr	(+) > 300	(-) 0,21	(-) 0,064	(-)	(-) 0,020	(-) 0,111
12	(+) 8	(-) 0,04	(-) 0	nr	(-) 0	nr	(-) 0,074	(-)	(-) 0,019	(-) 0,121
➔P11	(+) 7	(-) 0,04	(-) 0	nr	(-) 0	(-) 0,08	(-) 0,02	(-)	(-) 0,022	(-) 0,075
➔P5	(+) 10	(-) 0,09	(-) 0	nr	(-) 0	(-) 0,12	(-) 0,052	(-)	nr	nr

(+) positivo; (-) negativo; nr- não realizado; CMV - Citomegalovírus; RUB - Rubéola; Toxo - Toxoplasmose; HBsAg - antígeno de superfície do vírus da Hepatite B; anticorpo anti-HBs; EIE - ensaio imunoenzimático; IFI - imunofluorescência indireta; CO – *Cutoff* valores acima representam resultados positivos; ZC – zona cinza.

3.2. AVALIAÇÕES PRÉ-VACINAIS

Doze macacos cynomolgus machos foram selecionados do Centro de criação de animais de laboratório - Cecal/Fiocruz com idade em anos de $10,0 \pm 2,7$ e com peso de $6,9 \pm 0,59$ Kg. Estes animais foram avaliados por 36 meses para serem determinados os valores de normalidade para a maioria dos parâmetros apontados neste estudo. No total, seis exames clínicos e laboratoriais completos foram realizados neste período.

3.3. EXAMES PRÉ-VACINAIS

Os animais foram acompanhados quanto ao desenvolvimento corporal através de diferentes aferições, como peso, comprimento do corpo, comprimento de cauda e perímetro torácico. Além disso, foram realizadas avaliações coproparasitológicas periodicamente para o acompanhamento dos principais parasitos intestinais e a eficácia do tratamento antiparasitário empregado.

Os macacos cynomolgus foram acompanhados quanto aos exames hematológicos e bioquímicos antes do esquema vacinal (tabelas 5 e 6), e estes, foram realizados juntamente com as análises imunológicas. Como o hemograma varia de acordo com as condições ambientais, a alimentação e, principalmente, o estresse, a cada avaliação imunológica, novos hemogramas

completos eram realizados, para se obter o estado de saúde dos animais no momento das análises.

Tabela 5: Valores hematológicos pré-vacinais dos macacos cynomolgus que serão utilizados como base para as comparações pós-vacinais.

	Cynomolgus (n=15)	
	Média ± SD	Intervalo
Hemácias (x10⁶/mm³)	6,33 ± 0,52	5,25 - 7,24
Hemoglobina (g/dL)	12,05 ± 0,80	9,8 - 12,9
Hematócrito (%)	42,33 ± 2,69	34,7 - 45,6
Plaquetas (x10³/mm³)	401,93 ± 108,46	267 - 685
VGM (fL)	67,07 ± 4,42	61,9 - 76
HGM (pg)	19,09 ± 1,12	17,5 - 20,6
CHGM (%)	28,48 ± 0,75	26,9 - 30,4
Leucometria (x10³/mm³)	10,54 ± 3,16	5,9 - 17,1

VGM= volume globular médio; HGM= hemoglobina globular média; CHGM, concentração de hemoglobina globular média.

Tabela 6: Valores bioquímicos pré-vacinais dos macacos cynomolgus que serão utilizados como base para as análises pós-vacinais.

	Cynomolgus (n=15)	
	Média ± SD	Intervalo
Albumina (mg/dL)	3,27 ± 0,27	2,60 - 3,52
Creatinina (mg/dL)	1,06 ± 0,26	0,78 - 1,57
Glicose (mg/dL)	66,41 ± 16,18	33,42 - 94,92
Proteína (g/dL)	7,46 ± 0,42	6,98 - 8,20
Uréia (mg/dL)	23,16 ± 7,7	14,00 - 41,93
Triglicérides (mg/dL)	47,90 ± 17,83	19,97 - 74,52
Colesterol (mg/dL)	134,55 ± 28,80	75,00 - 185,13
Bilirrubina total (mg/dL)	0,27 ± 0,05	0,19 - 0,40
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,06 ± 0,10	0,01 - 0,42
AST (UI/L)	29,92 ± 9,81	11,01 - 43,86
ALT (UI/L)	37,43 ± 7,03	26,67 - 49,21

AST= aspartato amino transferase; ALT= alanino aminotransferase.

3.4 – ALOJAMENTO DOS ANIMAIS

Os animais selecionados foram retirados da colônia do Serviço de criação de primatas não humanos do Centro de criação de animais de laboratório - Cecal, Fiocruz, e alojados em gaiolas individuais para o regime de quarentena em contêiner de experimentação (figura 2). Neste ambiente, a iluminação (regularidade de luz de 12 em 12 horas) e temperatura (20 a 25°C), foram controladas diariamente, permitindo assim, que os animais tivessem conforto térmico e estabilidade luminosa, evitando possíveis interferências nos resultados devido ao stress.

A higienização, limpeza, alimentação, vistoria do contêiner e contenção física e química dos animais foi rigorosamente controlada, assim como a entrada e manipulação dos animais pelos médicos veterinários responsáveis.

A alimentação dos animais foi adotada de acordo com a espécie, e previamente estabelecida pelos médicos veterinários e biólogos do Cecal. A dieta foi composta de uma ração seca (ração peletizada própria para primatas não-humanos Nuvital[®]) e de uma ração *in natura* constituída de frutas (laranja, banana, melancia, mamão, abacaxi, maçã, etc.), legumes (abobara, berinjela, chuchu, batata doce, cenoura, beterraba, jiló, etc.) e verduras (couve, bortalha, vagem, agrião, etc.). Ovos cozidos e sementes de girassol foram oferecidos duas vezes por semana e água foi fornecida *ad libitum*.

Toda e qualquer alteração no andamento normal do contêiner foi registrado em livro, juntamente com o detalhamento da alteração contendo a data, a hora do acontecimento bem como a assinatura dos veterinários. Os

animais possuíam fichas de registros individuais para toda avaliação clínica e imunológica, além do controle na quantidade de sangue retirado para cada procedimento.



Figura 2: Imagem do contêiner de experimentação (vista de fora), onde os animais foram alojados durante o estudo.

3.5. PROCEDIMENTO DE CONTENÇÃO DOS ANIMAIS

A contenção foi realizada em todo procedimento no qual houvesse a manipulação direta do animal como: realização do teste tuberculínico, pesagem, coleta de sangue, análise clínica completa, com aferição de

temperatura, frequências cardíaca e respiratória, ausculta pulmonar, palpações e exame de mucosas aparentes.

A contenção física foi realizada através de um dispositivo que limita os movimentos dos animais (*squeeze back*), permitindo a administração de drogas para contenção química. A contenção química foi feita com a administração de 10mg/Kg de cloridrato de quetamina (Vetanarcol[®]), por via intramuscular. Em seguida, os animais, eram então, monitorados quanto à frequência de batimentos cardíacos (estetoscópio convencional) e respiratórios (pela observação da expansão torácica em um minuto, contando o número de inspirações), e presença de reflexos.

3.5.1 - Obtenção de amostras de sangue

A coleta de sangue foi realizada através da punção da veia femoral com uso de agulhas (0,25 x 0,07cm) e tubos *vacutainer* com anticoagulante para as análises hematológicas e imunológicas e tubos sem anticoagulante para a utilização do soro nas análises bioquímica e sorológica. Os soros foram devidamente armazenados em *freezer* a -70°C para posteriores pesquisas.

3.6 – ESQUEMA VACINAL

Doze macacos cynomolgus foram imunizados por via intramuscular em ambos os músculos quadríceps (direito e esquerdo) pela técnica de eletroporação (Somari *et al.*, 2000). Para tal, foi utilizado o equipamento da Inovio Biomedical Co (San Diego/CA - USA), ajustado conforme os seguintes parâmetros: Time=60; Ntrain=1; Nsequence=2; Volt=200. Os animais foram quimicamente contidos como descrito no item 3.5.

Para o estudo, os animais foram divididos em dois grupos: oito (P5, N3, P7, M7, P11, H3, M1, L9) imunizados com o plasmídeo pVAX-hsp65 nu (1000 μ g) e quatro (J1, Q9, M5, O9) receberam o plasmídeo pVAX “vazio” (denominados de grupo controle) (figura 3). Os animais receberam 3 doses da vacina com intervalo de 30 dias entre as imunizações (figura 4).



Figura 3: Etapas da vacinação com pVAX-hsp65 em macacos cynomolgus. (A) aparelho que emite os impulsos elétricos e a pistola de vacinação. (B) agulhas para injeção intramuscular anterior ao estímulo elétrico. (C) animal sob efeitos de fármaco dissociativo e tricotomia ampla do local de aplicação (músculos quadríceps direito e esquerdo).

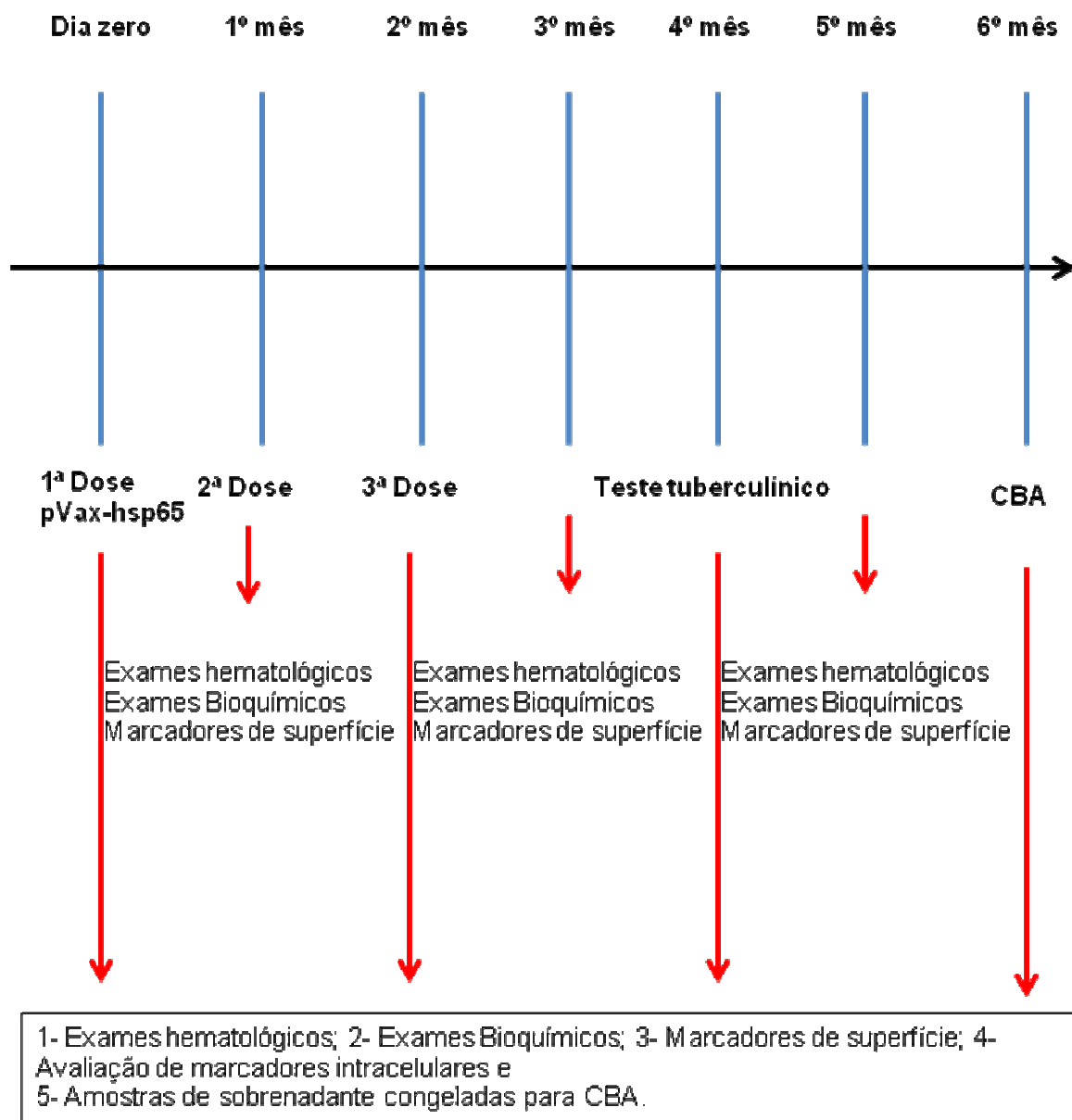


Figura 4 - Delineamento experimental. Na parte superior da figura estão representados a cinética e os grupos experimentais. Na parte inferior estão descrito os experimentos realizados.

3.7- EXAMES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS PÓS-VACINAL

Estes exames foram realizados para a completa avaliação do estado clínico dos animais e para averiguar possíveis efeitos adversos à vacinação. Dentre eles foram realizados: quantificação de leucócitos totais, análise do eritrograma e bioquímica para a identificação de testes de função renal (níveis séricos de ureia e creatinina), perfil lipídico (triglicérido e colesterol), glicose sérica e teste de função hepática (bilirrubina total, proteína total, albumina, aspartato aminotransferase - AST e alanina aminotransferase - ALT). Os exames foram realizados seguindo protocolo do Laboratório de Patologia Clínica do Ipec-Fiocruz. Os níveis de normalidade para este grupo de animais foram determinados pelas análises pré-vacinais.

3.8 – AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS EVENTOS ADVERSOS

Os animais foram avaliados quanto a possíveis eventos adversos decorrente da imunização com a vacina pVax-hsp65 por eletroporação. O acompanhamento veterinário foi realizado diariamente para identificar quaisquer efeitos inesperados decorrentes do processo de vacinação. Para a avaliação dos eventos adversos locais, foram observadas possíveis lesões: a) equimoses; b) hematomas; c) úlceras; d) abscessos; e) linfadenopatia regional supurada e f) cicatriz quelóide.

Para a avaliação de possíveis eventos adversos sistêmicos foram avaliados: a) perda de peso; b) febre $>40,0^{\circ}\text{C}$ ($>48\text{h}$ de duração); c) taquicardia ou bradicardia, através das aferições das frequências cardíacas; d) dispnéia, através das aferições das frequências respiratórias; e) vômitos; f) icterícia (bilirrubinas $>1.5 \times$ o valor normal); g) disfunção hepática (elevação de AST e ALT $3 \times$ normal); h) disfunção renal (elevação de uréia e creatinina $1,5 \times$ o normal, sem história de doença renal prévia) e i) trombocitopenia (plaquetas $<100,000/\mu\text{L}$).

3.9 – TESTE TUBERCULÍNICO

O teste foi realizado usando 0,1mL de tuberculina de mamíferos (Synbiotics, San Diego, California, EUA) por via intradérmica na pálpebra, com o animal previamente anestesiado com cloridrato de quetamina (10mg/Kg peso). A reação palpebral foi mensurada em 48 e 72h utilizando o score padrão que varia de 0 a 5. Neste sistema de avaliação, no grau zero tem-se a reação negativa, sem que haja modificações do perfil da epiderme; grau 1: presença de equimose; grau 2: com eritema sem inchaço local; grau 3: com eritema e mínimo inchaço ou ligeiro inchaço sem eritema; grau 4: com inchaço bem marcado causando fechamento do olho e vários graus de eritema; grau 5: com inchaço, necrose e oclusão total do olho (Richter, 1984). A presença de score de grau 3 ou superior é considerado positivo para o teste tuberculínico. O exame foi realizado antes e 2 meses após o término do esquema vacinal.

3.10 - AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES NOS MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR INDUZIDAS PELA VACINAÇÃO COM PVAX-HSP65

3.10.1 - Avaliação do perfil de linfócitos, células natural killer

O fenótipo de superfície celular foi realizado em amostras de sangue total em EDTA. As células foram marcadas com anticorpos para antígeno humanos que apresentavam comprovada reação cruzada com antígenos de macacos cynomolgus (tabela 3), através da pesquisa realizada no *Nonhuman Primate Reagent Resource*, disponível no link:

<http://nhpreagents.bidmc.harvard.edu/nhp/default.aspx>.

Os anticorpos estavam marcados com os fluorocromos: PE, FITC, PercP, PercPCy5.5, APC, Alexa 700 e ECD.

Para cada perfil celular uma determinada composição de anticorpos foi utilizada, onde cerca de 30 μ L foi adicionado a 85 μ L de sangue total, homogeneizado em vortex por 10 segundos. A incubação foi feita por 30min em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Foi adicionada em seguida 4mL de solução de Facslyse® (BD Biosciences) diluída 1:10 em água destilada, homogeneizado em vortex. Seguiu-se uma incubação por 15 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 4000g, removendo em seguida o sobrenadante, lavando posteriormente com 4mL de PBS refrigerado. Uma nova centrifugação foi realizada por 5 min a 4000g, desprezando o sobrenadante e, em seguida,

300 μ L de PBS/Formalina 2% foi adicionada. O material foi mantido a 4°C, ao abrigo de luz, até a leitura no citometro de fluxo CyAn ADP (DakoCytomation).

Para determinação do perfil de linfócitos T foram utilizadas as seguintes combinações de anticorpos: células TCD4 (CD3⁺/CD4⁺), TCD8 (CD3⁺/CD8⁺), células B (CD3⁻/CD20⁺), além da avaliação de células NK (CD3⁻/CD8⁺/CD16⁺).

Tabela 3: Anticorpos monoclonais utilizados e seus clones

Anticorpos	Clone	Fabricante
CD3	SP34	BD PHARMIGEN
CD4	L200	BD PHARMIGEN
CD8	SK1	BD PHARMIGEN
CD14	M5E2	BD PHARMIGEN
CD16	3G8	BD PHARMIGEN
CD20	2H7	BD PHARMIGEN
CD28	CD28.2	BD PHARMIGEN
CD11c	S-HCL-3	BD PHARMIGEN
CD69	FN50	BD PHARMIGEN
CD95	DX2	BD PHARMIGEN
CD123	7G3	BD PHARMIGEN
HLA-DR	L243	BD PHARMIGEN

3.10.2 - Avaliação do perfil de marcadores de memória central e memória efetora

O protocolo utilizado no item 3.10.1 foi empregado para a determinação de células TCD4 (CD3⁺/CD4⁺), TCD8 (CD3⁺/CD8⁺), de memória central (CD28⁺/CD95⁺), e de memória efetora (CD28⁻/CD95⁺), como descrito previamente para primatas não humanos por Jankovic *et al.* (2003).

3.10.3 - Avaliação do perfil de células dendríticas mielóides e plasmocitóides

O protocolo utilizado no item 3.10.1 foi empregado para a determinação do perfil de células dendríticas. As células dendríticas (DC) foram caracterizadas utilizando-se um “pool de anticorpos” com o mesmo fluorocromo (Linhagem negativa – Lin⁻) com a seguinte combinação: CD3⁻/CD14⁻/CD16⁻/CD20⁻, excluindo assim a possibilidade de marcação por outro tipo celular. Para a identificação de DC, foi utilizada a marcação de Lin⁻, HLA-DR, CD11c e CD123. As DC foram subdivididas nos dois tipos: as mielóide - MDC (Lin⁻, HLA-DR⁺/CD11c⁺/CD123⁻) e plasmocitóide - PDC (HLA-DR⁺/CD11c⁻/CD123⁺).

3.11 - ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO

Células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram isoladas a partir de amostras de sangue heparinizado e separadas por gradiente de densidade em Histopaque®-1077 (Sigma) diluído previamente a 90% em tampão salina fosfato (PBS) estéril. As CMSP foram ressuspensas em meio RPMI (Invitrogen) e suplementado com soro fetal bovino (Sigma) a 10%, 10mM HEPES (Mediatech, Inc.; Herndon, VA), 1% L-glutamina (Invitrogen), 50U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina (Invitrogen). As CMSP foram contadas em microscópio óptico e sua quantidade ajustada de acordo com o experimento para marcadores intracelulares.

3.12 – AVALIAÇÃO DE MARCADORES INTRACELULARES

Para a avaliação da ativação celular induzida pela vacinação com pVax-hsp65 foram utilizados estímulos não específicos com moléculas co-estimulatórias (CD49d e CD28) e específicos com peptídeos da HSP65. Assim, as moléculas co-estimulatórias CD49d (10µg/mL) e CD28 (10µg/mL) foram adicionadas aos tubos de citometria para sensibilização por 1 hora a 37°C em ambiente de 5% de CO₂, com inclinação de 5° (Gauduin et al, 2004). Os tubos foram lavados duas vezes com PBS estéril em temperatura ambiente.

Após esta etapa, foram adicionadas $1,0 \times 10^6$ células/tubo em 1mL de meio RPMI, contendo 10 μ g/mL de pool de peptídeos cobrindo toda a proteína HSP65 ou SEB/A (0,1 μ g/mL) ou meio sozinho (controle da reação). As células foram novamente incubadas por 6h (37°C a 5% de CO₂). Nesta etapa, foram removidos 200 μ L do sobrenadante que foram utilizados para a dosagem de citocinas Th1 e Th2 como descrito posteriormente no item 3.9. As amostras foram mantidas em freezer -70°C até o uso.

Duzentos μ L de RPMI foi repostado em cada tubo e foi adicionado 1 μ L de brefeldina por tubo e incubados por até 10h. Ao final da incubação, os tubos foram centrifugados por 5min a 400g em temperatura ambiente e em seguida lavados com 1mL de PBS.

A marcação de antígenos de superfície foi realizada pela adição de 30 μ L do mix de anticorpos a cada tubo, que foram incubados por 30min à 4°C. Em seguida, os tubos foram lavados com 1mL de PBS e centrifugados por 5min a 400g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado. Foram acrescentados 150 μ L da solução de Cytofix™ (BD Biosciences) por tubo e incubados por 20min à 4°C. Em seguida, os tubos foram lavados com 1mL de PermWash™ (BD Biosciences) e centrifugados por 5min a 400g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e 30 μ L do mix de anticorpos para marcação intracelular foram adicionados e incubados durante 30min à 4°C (tabela 4). Em seguida os tubos foram lavados com 1mL de PermWash e centrifugados por 5min a 400g em temperatura ambiente. Após a lavagem com PermWash, foram adicionados 100 μ L de Cytofix por tubo e incubados por 20min à 4°C. Após a incubação, os tubos receberam 700 μ L de PBS para leitura final em citometro de fluxo CyAn ADP (DakoCytomation). O

material foi mantido a 4°C, ao abrigo de luz, até a leitura. A avaliação de marcadores intracelulares foi realizada a cada 60 dias.

Tabela 4: Anticorpos monoclonais utilizados e seus clones

Anticorpos	Clone	Fabricante
CD3	SP34	BD PHARMIGEN
CD4	L200	BD PHARMIGEN
CD8	SK1	BD PHARMIGEN
CD14	M5E2	BD PHARMIGEN
CD16	3G8	COULTER
CD20	B9E9	COULTER
CD69	FN50	BD PHARMIGEN
TNF- α	Mab 11	BD PHARMIGEN
IL-10	JES3-9D7	CATALG
BCL-2	100	BD PHARMIGEN
IFN- γ	4S.B3	BD PHARMIGEN
Granzima B	GB12	CATALG
Perforina	Biotinilada	MABTECH
Ki-67	B56	BD PHARMIGEN
IL-12	Biotinilada	MABTECH

Para estas análises buscou-se a determinação em células mononucleares do sangue periférico de marcadores tais como:

- a) Marcador de ativação celular CD69 em células TCD4 (CD3⁺/CD4⁺), TCD8 (CD3⁺/CD8⁺) e células B (CD3⁻/CD20⁺);
- b) Expressão de granzima B e perforina em células TCD8 (CD3⁺/CD8⁺) e NK (CD3⁻/CD8⁺/CD16⁺);
- c) Expressão de citocinas intracelulares como IFN- γ em células TCD4 (CD3⁺/CD4⁺), TCD8 (CD3⁺/CD8⁺) e NK (CD3⁻/CD8⁺/CD16⁺); TNF- α em células TCD4 (CD3⁺/CD4⁺), TCD8 (CD3⁺/CD8⁺), NK (CD3⁻/CD8⁺/CD16⁺) e células B (CD3⁻/CD20⁺); IL-10 em células TCD4 (CD3⁺/CD4⁺), TCD8 (CD3⁺/CD8⁺) e IL-12 em monócitos (CD3⁻/CD14⁺);
- d) Expressão da molécula Ki67 em células TCD4 (CD3⁺/CD4⁺), TCD8 (CD3⁺/CD8⁺) e células B (CD3⁻/CD20⁺);
- e) Expressão da molécula Bcl2 em TCD4 (CD3⁺/CD4⁺), TCD8 (CD3⁺/CD8⁺).

3.13 – CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS DO TIPO TH1 E TH2 NOS SOBRENADANTES DE CULTURAS

As amostras de sobrenadantes congeladas, como descritos no item 3.8, nos vários períodos do esquema de vacinação (dia zero, 2, 4 e 6 meses após a primeira dose da vacina) foram utilizadas para a determinação de citocinas através do kit *Non-human Primate Th1/Th2 Cytokine Kit* (BD Pharmigen), que quantifica a concentração de IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5 e IL-6.

Para cada ponto do esquema vacinal foram utilizados sobrenadantes provenientes de cultivo celular com pool de peptídeo de HSP65, SEB/A e meio RPMI, sendo os dois últimos controles da reação. As amostras obtidas foram descongeladas e centrifugadas a 5000g por 5min a 4°C para a coleta de sobrenadante livre de células. Foram adicionados 18 μ L da suspensão das microesferas a cada 25 μ L da amostra a ser avaliada ou a 25 μ L de cada concentração da curva padrão. As amostras foram então incubadas por 3h em temperatura ambiente ao abrigo de luz. Após a incubação, as amostras foram lavadas, centrifugadas e os sobrenadantes descartados. Foram adicionados 100 μ L de tampão de lavagem em cada tubo para a realização da leitura em citômetro de fluxo CyAn ADP (DakoCytomation).

Os resultados foram expressos em pg/mL a partir da curva padrão para cada citocina. A concentração final das citocinas para o estímulo específico com o pool de peptídeos de HSP65 foi obtida após a subtração dos valores encontrados no tubo controle, contendo somente o meio de cultura. As amostras estimuladas com SEB/A foram utilizadas como controle positivo do

estímulo. Somente foram considerados os experimentos em que havia estimulação positiva com SEB/A.

3.14 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas comparando as médias de cada experimento entre os grupos vacinados e controle em cada tempo do protocolo de vacinação pelo teste de Mann Whitney (não pareado), e também foram comparadas as médias de cada experimento entre cada tempo do protocolo de vacinação e os animais antes da vacinação (dia zero) através do teste de Wilcoxon (teste pareado). Consideramos como valor de significância estatística valores de $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando programa gráfico Prism 5.0 (Graph-Pad, San Diego, CA).

4-Resultados

4 – RESULTADOS

4.1 – ANÁLISE CLÍNICA PÓS-VACINAL

4.1.1 Avaliação das alterações hematológicas

A mensuração da contagem de glóbulos brancos totais e vermelhos foi determinada mensalmente. Os animais não apresentaram alterações nestes parâmetros após a vacinação, por até 6 meses, demonstrando que a vacina não provoca alterações nas contagens de leucócitos totais e hemácias (tabela 7). Observamos que houve um aumento do valor do hematócrito somente no 6^o mês/pós-vacinação (p.v.) que foi evidenciado somente no grupo vacinado ($44,0 \pm 2,5\%$), este aumento foi significativo quando a análise foi realizada em relação ao dia zero da vacinação ($42,0 \pm 1,8\%$; $p= 0,016$), contudo, não foi observada diferença entre os grupos vacinados e controle no mesmo mês ($41,6 \pm 3,3\%$). Este aumento estava relacionado ao aumento do VGM neste período da avaliação no grupo vacinado ($66,5 \pm 3,9\text{fl}$) em relação ao dia zero da vacinação ($62,7 \pm 4,0\text{fl}$; $p=0,008$), mas não em relação aos animais do grupo controle neste mesmo período ($65 \pm 4,7\text{fl}$; figura 5). Outro dado observado foi a diminuição das médias na contagem plaquetária, comparando o dia zero ($475 \pm 12,4 \times 10^3/\text{mm}^3$) aos 4^o e 5^o meses/p.v. ($375 \pm 59 \times 10^3/\text{mm}^3$; $386 \pm 11,2$

$\times 10^3/\text{mm}^3$, respectivamente, $p=0,008$ para ambas as análises) (figura 6). Da mesma forma, não houve diferença entre os grupos controle e vacinado nos respectivos meses. Não evidenciamos alterações nos valores de hemoglobina, CHGM e HGM (figura 6).

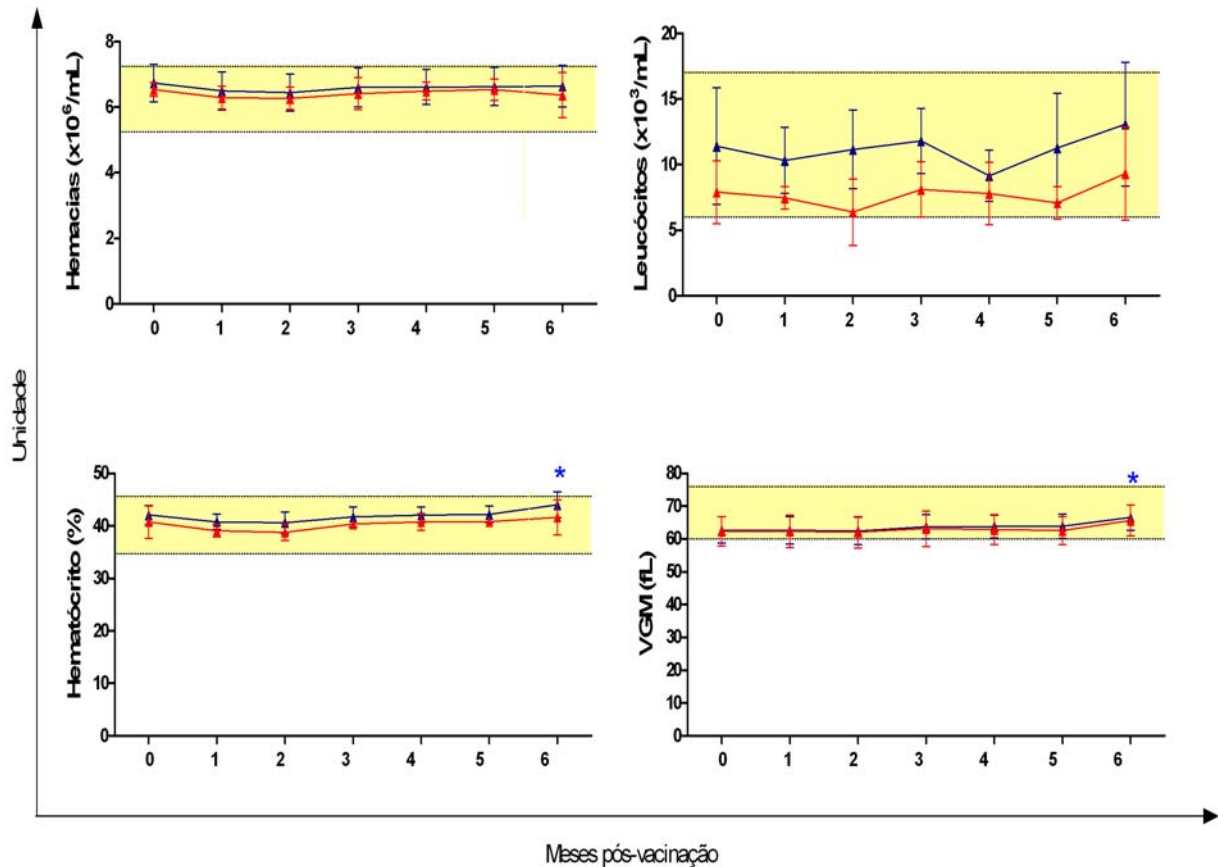


Figura 5: Cinética da avaliação dos parâmetros hematológicos dos macacos cynomolgus vacinados com pVAX-hsp65 (n=8, azul) e animais controle (n=4, vermelho). Os pontos representam a média e o desvio padrão para cada tempo pós-vacinação. A faixa amarela representa os valores de normalidade para estes animais, segundo avaliações pré-clínicas. *Alteração significativa da média encontrada no grupo vacinado quando comparado ao mesmo grupo no tempo zero ($p<0,05$ - Wilcoxon Test). VGM= volume globular médio.

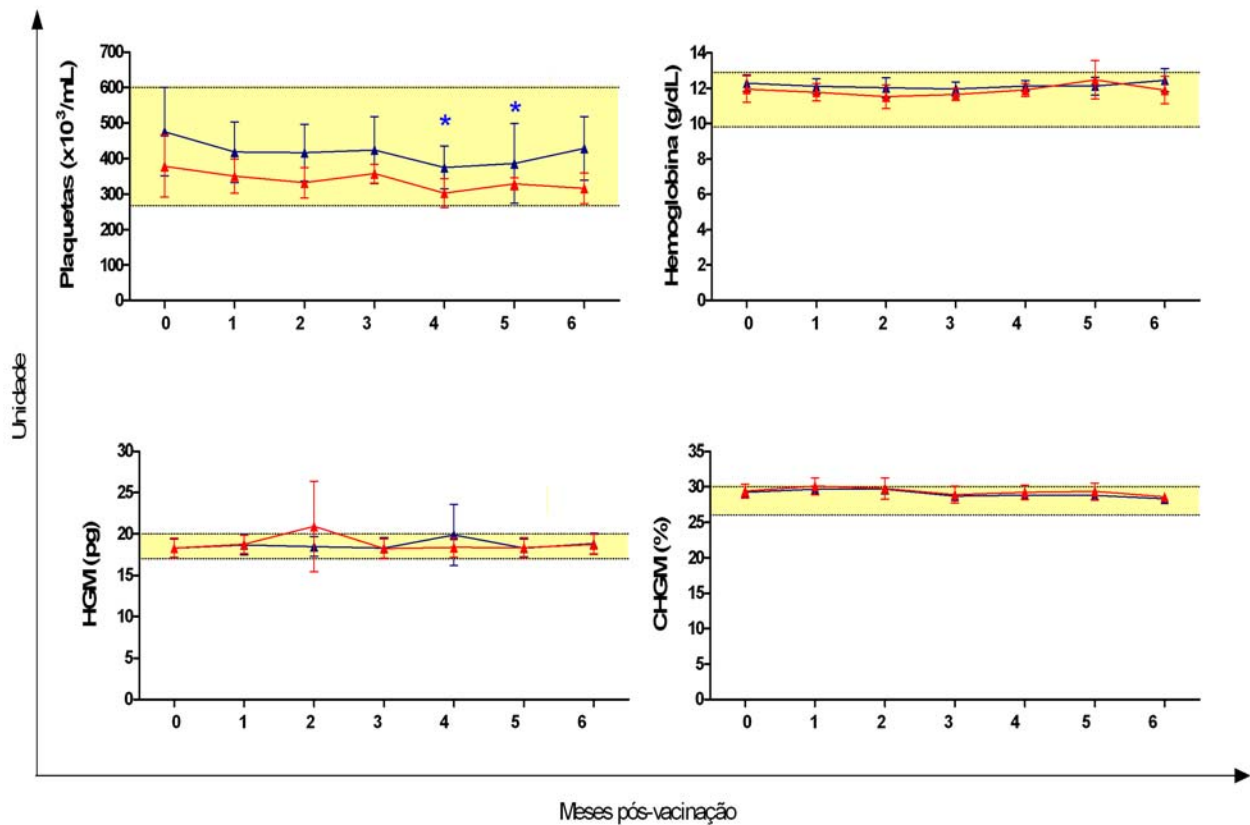


Figura 6: Cinética da avaliação dos parâmetros hematológicos dos macacos cynomolgus vacinadas com pVAX-hsp65 (n=8, azul) e animais controle (n=4, vermelho). Os pontos representam a média e o desvio padrão para cada tempo pós-vacinação. A faixa amarela representa os valores de normalidade para estes animais, segundo avaliações pré-clínicas. *Alteração significativa da média encontrada no grupo vacinado quando comparado ao mesmo grupo no tempo zero ($P < 0,05$ - *Wilcoxon Test*). HGM= hemoglobina globular média; CHGM, concentração de hemoglobina globular média.

Tabela 7: Cinética da avaliação dos parâmetros hematológicos dos macacos cynomolgus vacinadas com pVax-hsp65 (n=8) e animais controle (n=4).

	Tempo 0		1 Mês		2 Meses		3 Meses		4 Meses		5 Meses		6 Meses	
	Vacinado	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado	Controle
Hemácias(x10 ⁶ /ml)	6,7±0,6	6,5±0,2	6,5±0,6	6,3±0,3	6,4±0,6	6,2±0,3	6,6±0,6	6,4±0,5	6,6±0,5	6,5±0,3	6,6±0,6	6,5±0,3	6,6±0,6	6,4±0,7
Hematócrito(%)	42,0±1,8	40,7±3,1	40,8±1,5	39,1±1,2	40,1±2,1	38,8±1,6	41,7±1,9	40,3±0,6	42,1±1,5	40,8±1,6	42,2±1,6	40,8±0,8	44,0±2,5*	41,6±3,3
Hemoglobina (g/dl)	12,3±0,5	11,9±0,7	12,1±0,4	11,8±0,5	12,0±0,6	11,5±0,7	11,9±0,4	11,6±0,3	12,1±0,3	11,9±0,4	12,1±0,5	12,5±1,1	12,4±0,6	11,9±0,8
VGM(fl)	62,7±4,0	62,3±4,4	62,7±4,1	62,4±5	62,4±4,2	62,1±4,8	63,8±3,7	63,2±5,5	63,8±3,5	62,9±4,5	63,9±3,7	62,6±4,3	66,5±3,9*	65,±4,7
CHGM(%)	29,2±0,5	29,4±1,0	29,7±0,5	30,1±1,2	29,6±0,6	29,8±1,5	28,7±0,7	28,9±1,1	28,8±0,4	29,2±1,0	28,8±0,5	29,4±1,1	28,3±0,5	28,6±0,6
HGM(pg)	18,3±1,1	18,3±1,2	18,7±1,2	18,8±1,1	18,5±1,2	20,9±5,5	18,3±1,2	18,2±1,2	19,9±3,7	18,4±1,3	18,3±1,0	18,4±1,2	18,9±1,2	18,7±1,2
Leucócitos(x10 ⁹ /ml)	11,4±4,4	7,9±2,4	10,3±2,5	7,5±0,8	1,2±3,0	6,4±2,5	11,8±2,5	8,1±2,1	9,2±1,9	7,8±2,4	11,3±4,2	7,1±1,3	13,1±4,7	9,3±3,6
Plaquetas(x10 ⁹ /ml)	475±124	378±87	418±85	351±47	416±80	332±42	424±94	358±26	375±59*	303±40	386±112*	329±17	428±89	316±43

VGM: Volume Globular Médio; CHGM: concentração de hemoglobina globular média; HGM: hemoglobina globular média .

*Estatisticamente significante com $P < 0,05$ (Wilcoxon Test) – comparação com o tempo zero.

4.1.2- Perfil bioquímico sérico

4.1.2.1 Testes de função renal

Foram utilizadas as mensurações dos níveis séricos de uréia e creatinina para verificar o funcionamento renal dos animais após o esquema de vacinação (tabela 8). Não houve mudanças substanciais nas dosagens de creatinina ao longo dos seis meses de experimento. No entanto, podemos observar um aumento dos níveis de uréia no grupo de animais vacinados com pVAX-hsp65 quando comparamos o dia zero ($21,4 \pm 4,3$ mg/dL) com os períodos compreendidos entre os 3^o, 4^o e 5^o meses p.v. ($35,2 \pm 6,0$; $31,6 \pm 7,7$ e $37,2 \pm 8,6$ mg/dL, respectivamente, $p=0,014$; $0,021$ e $0,008$, respectivamente) (figura 7). Contudo, não houve diferença estatística entre os grupos vacinados e controles nos meses p.v. especificados acima. Apesar de termos evidenciado uma elevação nos valores de uréia em todos os animais, estes valores estavam dentro da faixa limite encontrada nas análises pré-vacinais.

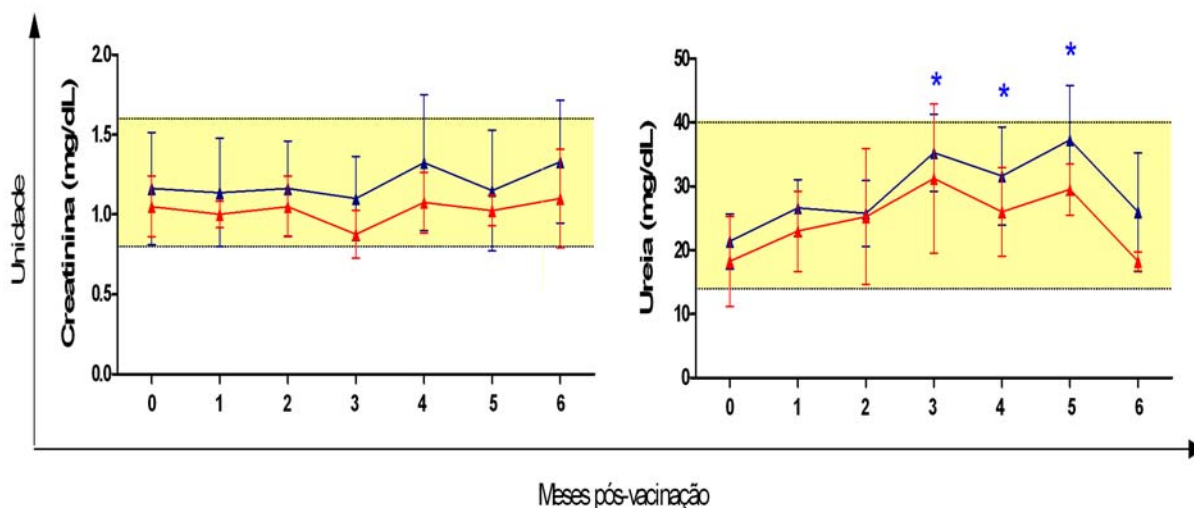


Figura 7: Cinética da avaliação dos parâmetros de creatinina e uréia dos macacos cynomolgus vacinadas com pVAX-hsp65 (n=8, azul) e animais controle (n=4, vermelho). Os pontos representam a média e o desvio padrão para cada tempo pós-vacinação. A faixa amarela representa os valores de normalidade para estes animais, segundo avaliações pré-clínicas. *Alteração significativa da média encontrada no grupo vacinado quando comparado ao mesmo grupo no dia zero ($p < 0,05$ (Wilcoxon Test)).

4.1.2.2 Perfil lipídico e glicose sérica

Para a análise do perfil lipídico foram mensurados os valores de triglicerídeos e colesterol, além disso, análise dos valores de glicose sérica foi realizada mensalmente (tabela 8). Não foram encontradas alterações nestes parâmetros durante o período estudado, revelando que a vacina pVAX-hsp65 não influencia no perfil lipídico nem na concentração de glicose sérica no período estudado (figura 8).

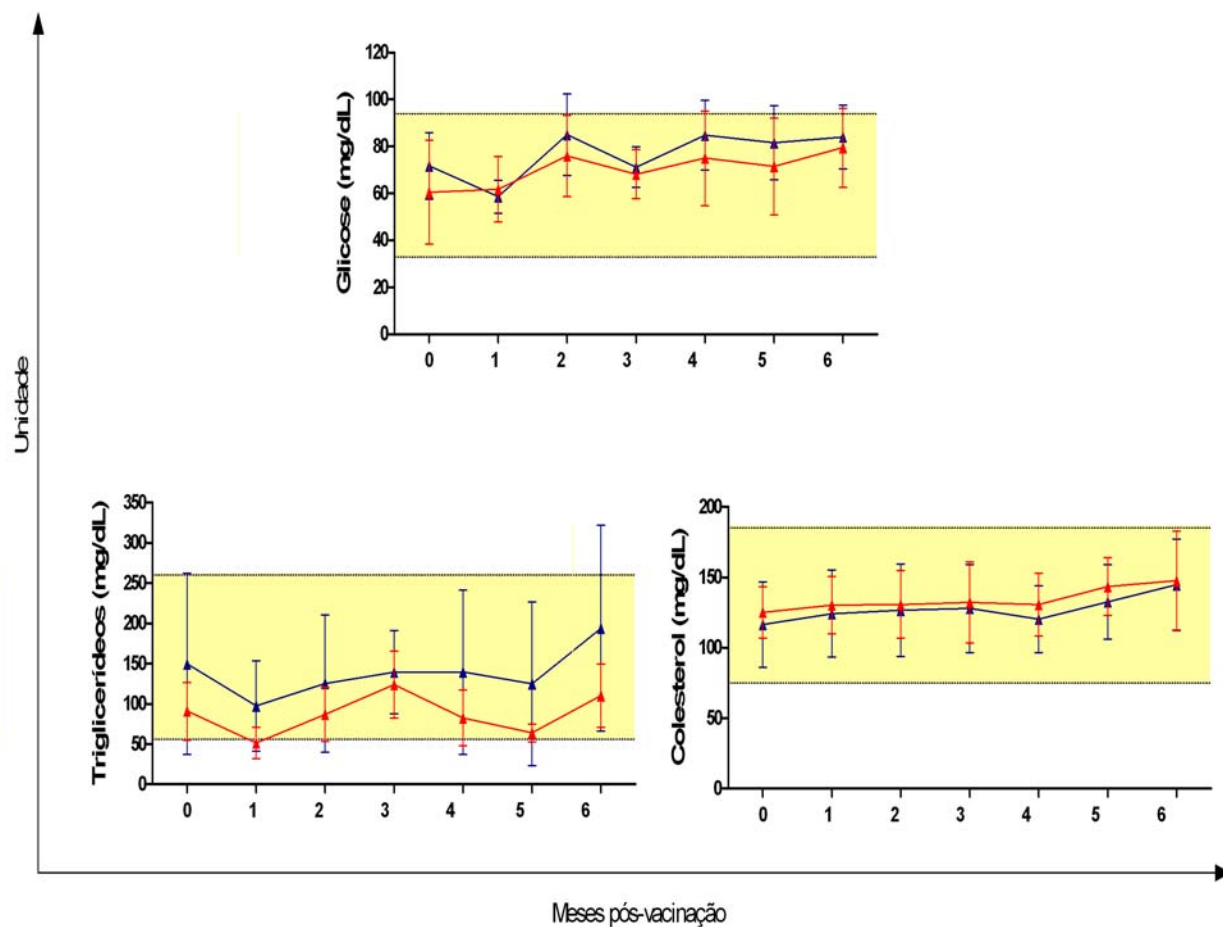


Figura 8: Cinética da avaliação da glicose sérica perfil e lipídico (triglicerídeos e colesterol) dos macacos cynomolgus vacinadas com pVAX-hsp65 (n=8, azul) e animais controle (n=4, vermelho). Os pontos representam a média e o desvio padrão para cada tempo pós-vacinação. Não foi encontrada alteração significativa das médias nos grupos estudados. A faixa amarela representa os valores de normalidade para estes animais, segundo avaliações pré-clínicas.

4.1.2.3 Testes de função hepática

Foram realizados testes bioquímicos para fornecer informações sobre a função hepática dos animais após a vacinação. Dentre os parâmetros utilizados, foram mensurados os níveis séricos de bilirrubina total, proteína

total, albumina e das enzimas hepáticas AST e ALT. Não houve mudanças substanciais nas dosagens de bilirrubina total, proteína total e albumina ao longo dos seis meses de experimento (tabela 8 e figura 9). Por outro lado, os níveis da enzima AST foram significativamente diminuídos nos animais vacinados com pVAX-hsp65, quando comparamos o dia zero ($32,9 \pm 10$ UI/mL) aos 2° e 4° meses/p.v. ($23,1 \pm 7,8$ e $23,4 \pm 6,3$ UI/mL, respectivamente; $p=0,04$ e $p=0,008$, respectivamente), mas dentro da faixa de normalidade para cynomolgus. Da mesma forma, os níveis de ALT mostraram diminuição quando os valores do dia zero ($37,1 \pm 8,1$ UI/mL) foram comparados aos valores observados do 1° ao 3° meses/p.v. ($29,4 \pm 4,6$; $29,6 \pm 4,6$; $30,9 \pm 4,4$ UI/mL, respectivamente, $p=0,02$ para todas as comparações) (figura 10). Como observado anteriormente, não evidenciamos diferença estatística entre o grupo vacinado e o grupo controle quando comparados nos tempos acima descritos.

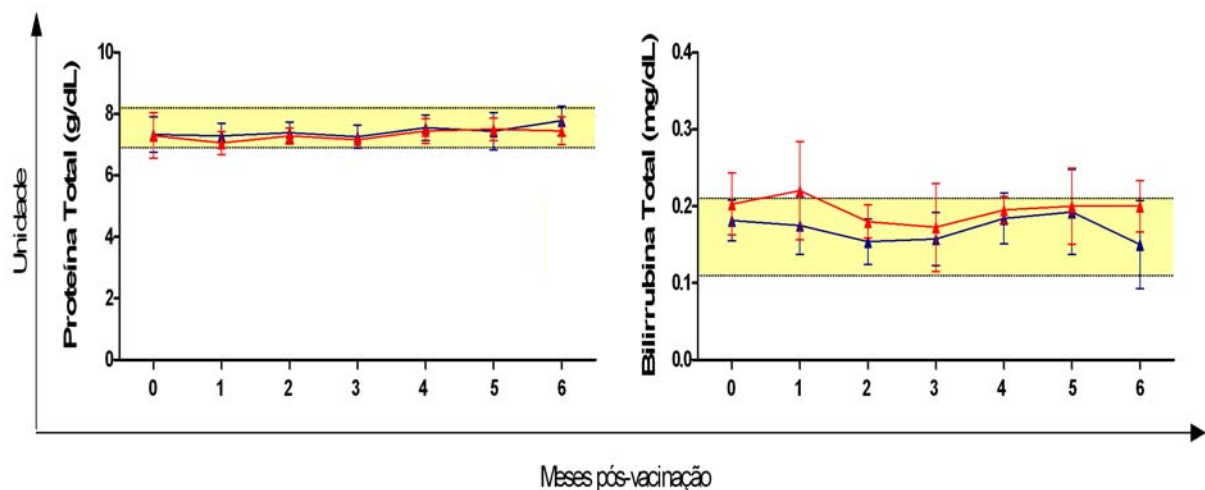


Figura 9: Cinética da avaliação dos parâmetros que avaliam a função hepática nos macacos cynomolgus vacinadas com pVAX-hsp65 (n=8, azul) e animais controle (n=4, vermelho). Os pontos representam a média e o desvio padrão para cada tempo pós-vacinação. A faixa amarela representa os valores de normalidade para estes animais, segundo avaliações pré-clínicas.

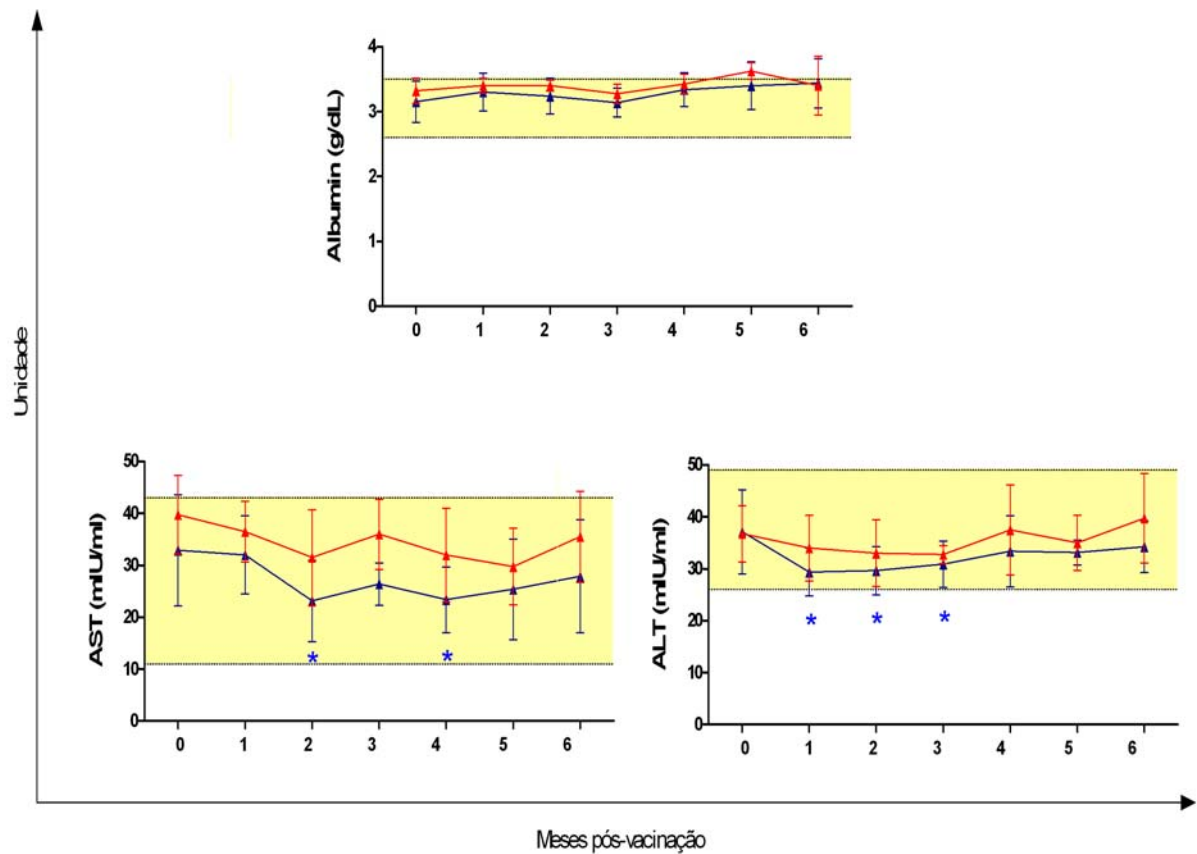


Figura 10: Cinética da avaliação dos parâmetros que avaliam a função hepática nos macacos cynomolgus vacinadas com pVAX-hsp65 (n=8, azul) e animais controle (n=4, vermelho). Os pontos representam a média e o desvio padrão para cada tempo pós-vacinação. A faixa amarela representa os valores de normalidade para estes animais, segundo avaliações pré-clínicas. *Alteração significativa da média encontrada no grupo vacinado quando comparado ao mesmo grupo no tempo zero ($P < 0,05$ (Wilcoxon Test)). AST= aspartato amino transferase; ALT= alanino aminotransferase.

Tabela 8: Cinética da avaliação dos parâmetros bioquímicos dos macacos cynomolgus vacinadas com pVax-hsp65 (n=8) e animais controle (n=4).

	Tempo 0		1 mês		2 meses		3 meses		4 meses		5 meses		6 meses	
	Vacinado	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado	Controle
Uréia	21,4±4,3	18,5±7,0	26,6±4,4	23,0±6,3	25,7±5,2	25,3±10,7	35,2±6,0*	31,2±11,7	31,6±7,7*	26,0±6,9	37,2±8,6*	29,5±4,0	26,0±9,7	18,2±1,5
Creatinina	1,2±0,35	1,0±0,19	1,1±0,34	1,0±0,08	1,2±0,30	1,0±0,19	1,1±0,26	0,9±0,15	1,3±0,42	1,1±0,19	1,1±0,38	1,0±0,10	1,3±0,38	1,1±0,31
Glicose	71,7±14,2	60,5±22,1	58,6±7,0	61,7±13,9	85,0±17,3	76,0±17,3	71,1±8,6	68,2±10,5	84,9±14,9	75,0±20,0	81,6±15,7	71,5±20,7	84,0±13,6	79,5±16,9
Triglicerídeos	149±112,5	91±35,7	97±56,1	51±19,5	125±85,3	87±33,4	139±51,7	124±41,4	139±102,2	82±34,5	125±101,5	64±10,7	194±127,9	110±39,5
Colesterol	116±30,2	125±18,4	124±30,8	130±20,2	127±32,7	131±23,9	128±31,3	132±28,6	120±23,8	131±22,4	132±26,6	143±20,5	145±32,4	148±35,1
Bilirubina Total	0,18±0,03	0,20±0,04	0,18±0,04	0,22±0,66	0,15±0,03	0,18±0,02	0,16±0,03	0,17±0,06	0,18±0,03	0,20±0,02	0,19±0,06	0,20±0,05	0,15±0,06	0,20±0,03
Proteína Total	7,3±0,57	7,3±0,74	7,3±0,41	7,0±0,37	7,4±0,35	7,3±0,26	7,2±0,37	7,1±0,13	7,5±0,42	7,4±0,40	7,4±0,60	7,5±0,37	7,8±0,48	7,4±0,45
Albumina	3,1±0,32	3,3±0,19	3,3±0,29	3,40±0,12	3,2±0,28	3,4±0,08	3,1±0,22	3,3±0,15	3,3±0,26	3,4±0,15	3,4±0,37	3,6±0,13	3,4±0,38	3,4±0,45
AST	32,9±10,7	40,0±8,0	32,0±7,5	36,5±5,9	23,1±7,8*	31,5±9,3	26,4±4,1	36,0±6,8	23,4±6,3*	32,0±9,0	25,4±9,7	29,7±7,4	27,9±10,9	35,5±8,7
ALT	37,1±8,1	36,7±5,4	29,4±4,6*	34,0±6,8	29,6±4,6*	33,0±6,9	30,9±4,4*	32,7±1,7	33,4±6,9	37,5±8,7	33,1±2,4	35,0±5,3	34,2±4,9	39,7±8,6

Uréia, creatinina, glicose, triglicerídeos, colesterol, bilirubina e proteínas totais: mg/dL.; AST – Aspartato aminotransferase e ALT – Alanino aminotransferase :mUI/mL

* Análises estatisticamente significativa com $p < 0,05$ (Wilcoxon Test) – comparação com o dia zero.

4.2 - AVALIAÇÃO DOS EVENTOS ADVERSOS

Todos os animais apresentavam um bom estado físico geral quando do início de nosso estudo, e assim, mantiveram-se durante todo o período. Apresentavam apetite normal, bom estado nutricional e de hidratação.

Os animais foram pesados a cada análise clínica completa, onde foram mensuradas também, as frequências cardíaca e respiratória, além da temperatura corporal. As primeiras 48h pós-vacinação foram essenciais para evidenciarmos qualquer alteração. A vacina pVAX-hsp65 não provocou vômitos, convulsões, febre, nem qualquer outro sinal que poderia estar relacionado a dor como: automutilação, perda de apetite e apatia.

Não foi possível evidenciar quaisquer alterações no local de aplicação da vacina como equimoses, hematomas, úlceras, abscessos, linfadenopatia regional supurada e cicatriz quelóide. Do mesmo modo, não foram encontradas alterações sistêmicas evidentes através dos exames clínicos complementares como os dados hematológicos e bioquímicos (visto no item 4.1).

4.3- TESTE TUBERCULÍNICO

O teste tuberculínico foi realizado dois meses após o término do esquema vacinal. A vacinação com pVAX-hsp65 por eletroporação em macacos cynomolgus não resultou em conversão ao teste de intradermoreação com a tuberculina de mamíferos. As leituras foram realizadas 48 e 72h após a

intraderrmorreação. Após 48h todos os animais mostraram reação negativa, apesar de 2 (25%) apresentarem reação de grau 2. Após 72h os resultados permaneceram negativos com 5 (62,5%) animais apresentando grau zero de reação e três (37.5%) animais mostraram grau 1 de reação com presença de equimose (tabela 9).

Tabela 9. Avaliação da reação de intraderrmorreação a tuberculina de mamíferos em macacos cynomolgus vacinados com pVAX-hsp56 por eletroporação

Macacos cynomolgus		Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau \geq 3
		Reação Negativa N (%)			Reação Positiva N (%)
Grupo Vacinado (n=8)	Leitura 48h	4 (50)	2 (25)	2 (25)	0 (0)
	Leitura 72h	5 (62,5)	3 (35,5)	0 (0)	0(0)

4.4 - AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR

4.4.1 - Avaliação do perfil de linfócitos e células natural killer periféricos induzidos pela vacinação com pVAX-hsp65 por eletroporação

As análises do percentual de células TCD4 e TCD8, linfócitos B e NK foram realizadas na região R1. As células NK foram identificadas em região negativa para CD3, sendo caracterizadas populações de NK como CD3⁻CD8⁺CD16⁺. Os linfócitos B foram identificados pela marcação de CD3⁻CD20⁺ dentro da população de linfócitos (figura 11).

Quanto ao perfil de linfócitos TCD4 não foi observado alterações ao longo do esquema vacinal. A média de linfócitos T CD4 no período anterior a vacinação foi de 36,63±19,48% (n=12). Como alguns animais apresentavam valores abaixo da média antes da vacinação, fomos acompanhando o perfil destas células ao longo do experimento e não observamos mudanças significantes. Quando a média do percentual de linfócitos TCD4 foi comparada entre o dia zero (32,8±8,9%) do grupo vacinado e os valores do 1^o e 4^o (29,3±6,6% e 27,4±7,4%) meses/p.v., observamos um ligeiro decréscimo nestas células periféricas ($p=0,02$ e $0,008$, respectivamente) (figura 12). Não foram encontradas diferenças estatísticas em relação aos valores absolutos de linfócitos TCD4 (tabela 10).

Em relação ao perfil de linfócitos TCD8 observamos que estas células eram mais frequentes que os linfócitos TCD4, tendo valores médios de 44,5±9,9% (n=12) no dia zero de vacinação. Quando comparamos os valores médios de entre o dia zero do grupo vacinado (45,9±11,0%) ao 4^o mês/p.v

(50,6±9,7%) encontramos diferença estatisticamente significativa ($p=0,04$) (figura 12). Não foram encontradas diferenças estatísticas em relação aos valores absolutos de linfócitos TCD8 (tabela 10).

Nenhuma alteração foi identificada no perfil de linfócitos B e células NK durante o esquema vacinal, tanto de valores percentuais quando de valores absolutos (figura 13).

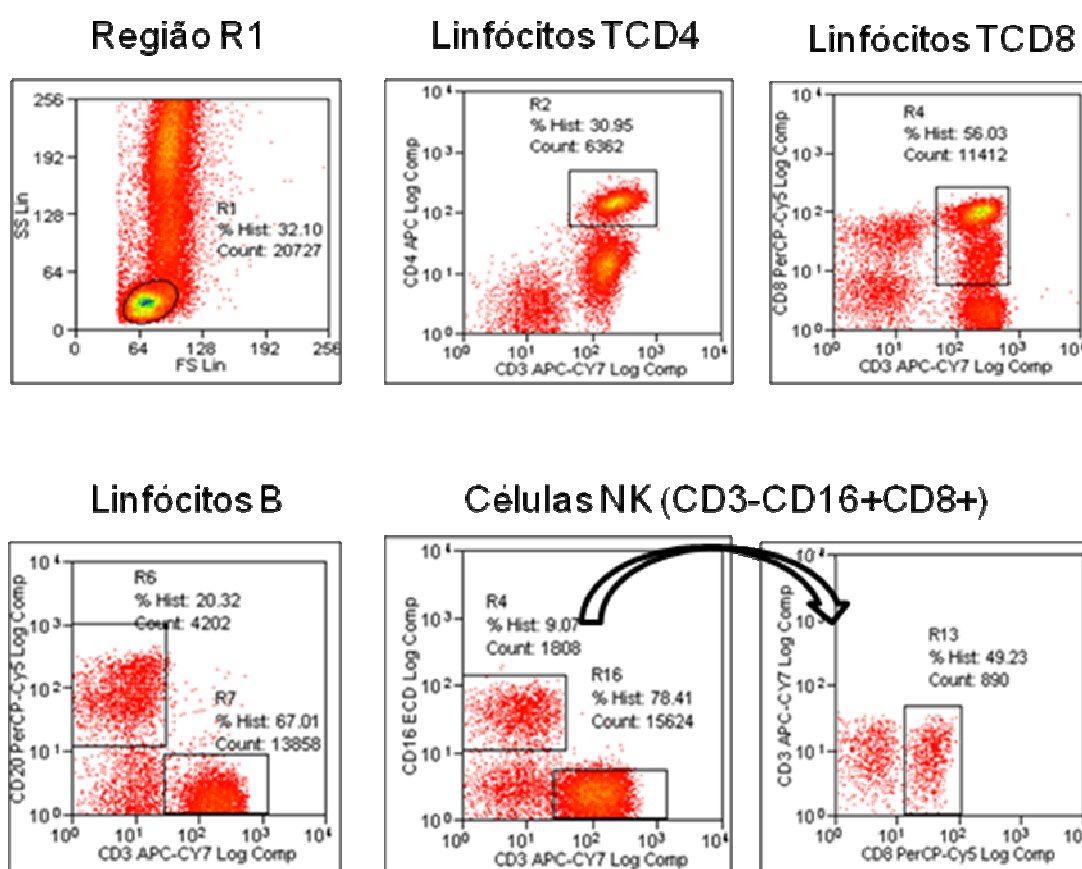


Figura 11: Paineis da análise de citometria de fluxo. Figuras representativas da avaliação de células TCD4 (CD3+/CD4+), TCD8 (CD3+/CD8+), linfócitos B (CD3-CD20+) e de células natural killer (CD3-CD16+CD8+). Cerca de 20mil células foram lidas na região R1.

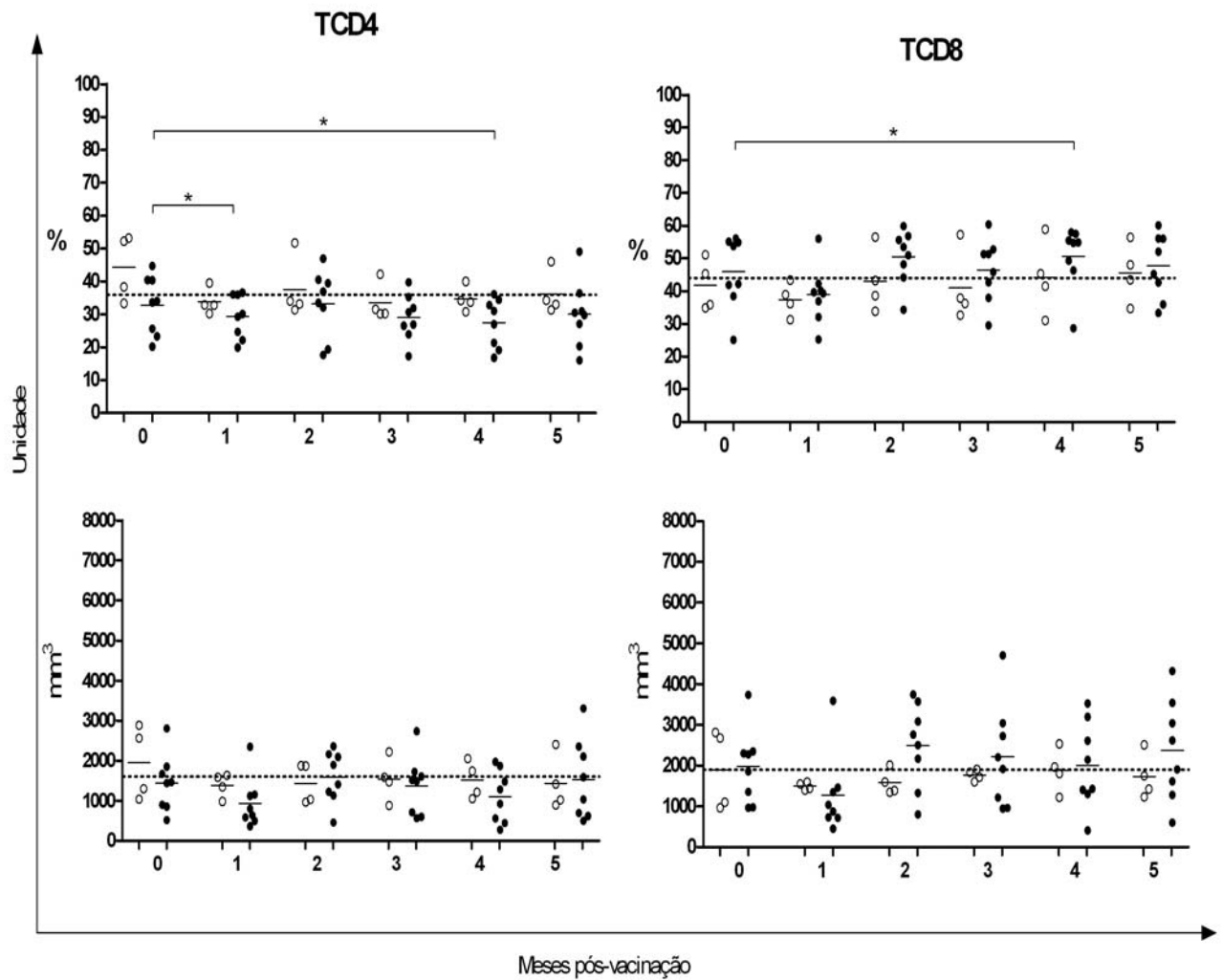


Figura 12: Cinética da avaliação de células TCD4 e TCD8 em valores percentuais (gráficos superiores) e valores absolutos (gráficos inferiores). Animais do grupo controle (n=4, branco) e animais vacinados (n=8, preto). A linha horizontal pontilhada representa a média de todos os animais no tempo zero. *Alteração significativa da média encontrada no grupo vacinado quando comparado ao mesmo grupo no tempo zero ($P < 0,05$ Wilcoxon Test).

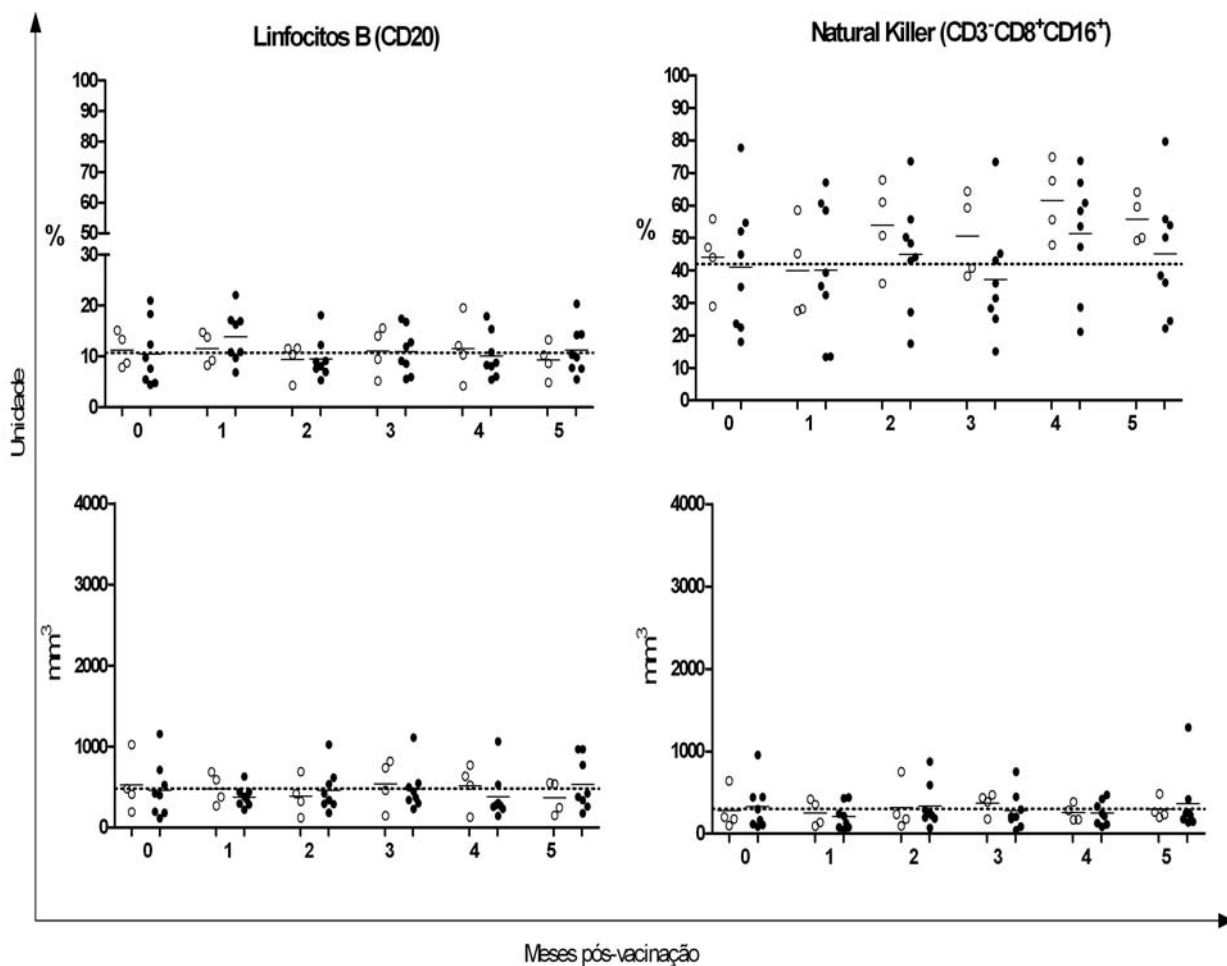


Figura 13: Cinética da avaliação de linfócitos B e NK em valores percentuais (gráficos superiores) e valores absolutos (gráficos inferiores). Animais controle (n=4, branco) e animais vacinados (n=8, preto). A linha horizontal representa a média de cada grupo. A linha horizontal pontilhada representa a média de todos os animais no tempo zero.

Tabela 10: Cinética da avaliação dos valores percentuais e absolutos de células TCD4, TCD8, linfócitos B e células Natural killer dos macacos cynomolgus vacinados com pVAX-hsp65 (n=8) e animais controle (n=4).

	Tempo 0		1 mês		2 meses		3 meses		4 meses		5 meses		
	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado	
%	TCD4	44,3±9,9	32,8±8,9	33,9±3,9	29,3±6,6*	37,6±9,5	30,0±10,2	33,6±5,8	29,1±6,9	34,7±3,9	27,4±7,4*	36,2±6,7	30,0±10,0
	TCD8	41,8±7,8	45,9±11,0	37,4±5,1	38,9±8,8	43,0±9,8	50,4±8,2	41,0±11,0	46,4±9,7	44,2±11,5	50,6±9,7*	45,6±9,1	47,7±9,9
	Linf B	11,25±3,5	10,5±6,3	11,5±3,3	13,8±5,0	9,4±3,5	9,5±3,9	11,0±4,7	11,0±4,5	11,5±6,3	10,0±4,4	9,2±3,5	11,2±4,8
	NK	43,9±11,2	41,03±20,27	39,9±14,9	39,9±20,7	153,9±13,9	44,9±17,1	50,7±13,1	37,1±17,6	61,5±12,1	51,3±18,2	55,7±7,3	45,1±18,8
mm ³	TCD4	1946±912,8	1437±741,5	1385±297,2	937,1±636	1434±504,1	1591±646,7	1541±547,8	1368±732,8	1516±464,2	1101±650	1434±683,7	1524±999,6
	TCD8	1894±990,5	1980±912,6	1500±90,72	1279±991,8	1589±305,2	2498±10,34	1767±135,7	2217±1276	1884±539,5	2006±1058	1731±560,3	2368±1240
	Linf B	526,3±353,6	461,8±342,1	479,9±191,7	378,2±128	387,5±236,2	461,2±267,3	539,5±304,8	479,2±275,4	513,2±275,3	383,7±295	369,6±202,5	533,6±318,2
	NK	281,5±244,1	327,9±292,0	251,5±159,9	207,4±155,5	316,6±297,2	334,7±264,7	370,2±131,4	278,3±228,6	255,3±102,1	252,6±145,1	296,5±128,6	361,9±348,8

* Análises estatisticamente significativa com $p < 0,05$ (*Wilcoxon Test*) – comparação com o dia zero.

Linf B – Linfócitos B; NK – células natural killer.

4.4.2 - Avaliação de marcadores de células de memória central e efetoras

Foram analisadas as subpopulações de células TCD4 e TCD8 de memória central, definidas como CD3+/CD4+ ou TCD3+/CD8+ e CD28+/CD95+ e de memória efetora, definidas como CD3+/CD4+ ou TCD3+/CD8+ e CD28-/CD95+ (figura 14). A vacina pVAX-hsp65 foi capaz de induzir um aumento significativo na subpopulação de linfócitos TCD4 de memória central ($34,1 \pm 15,9\%$ vs $49 \pm 12,1\%$, $p=0,008$) no 1° mês/p.v., retornando aos valores normais a partir do 2° mês/p.v. Não houve diferença entre os valores absolutos nesta população (figura 15). Observamos que houve uma tendência ($p=0,07$) a diminuição da subpopulação de linfócitos TCD4 de memória efetora neste mesmo período ($36,8 \pm 20,1\%$ vs $23,3 \pm 11,4\%$; figura 15). Nenhuma outra alteração foi evidenciada durante o esquema vacinal em relação às células TCD4 e que as células de memória central e efetora estavam em equilíbrio durante todo o período de vacinação.

Não observamos alterações no perfil de linfócitos TCD8+ de memória central e efetora durante o esquema vacinal, com leve tendência a aumento no 6° mês/p.v. em células de memória central (figura 16). Não houve diferença entre os valores absolutos nesta população quando comparados com os valores no tempo zero, porém, houve um aumento significativo no número absoluto destas células quando comparamos o grupo vacinado após a 1ª dose da vacina com o 6° mês ($248 \pm 129 \text{mm}^3$ vs $748 \pm 675 \text{mm}^3$, com $p=0,04$) (figura 16).

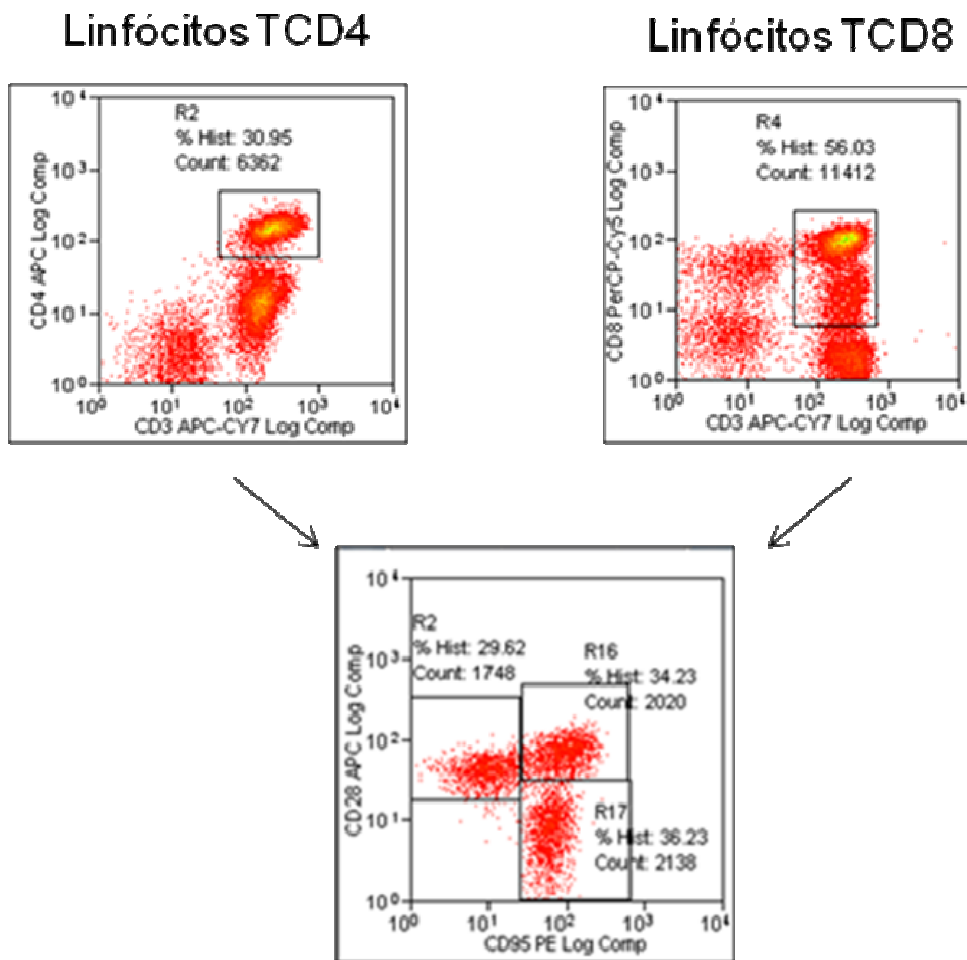


Figura 14: Paineis da análise de citometria de fluxo. Figuras representativas da avaliação de células TCD4 (CD3+/CD4+) e TCD8 (CD3+/CD8+) de memória central (CD28+CD95+) e memória efetora (CD28-CD95+). Cerca de 20mil células foram lidas na região R1.

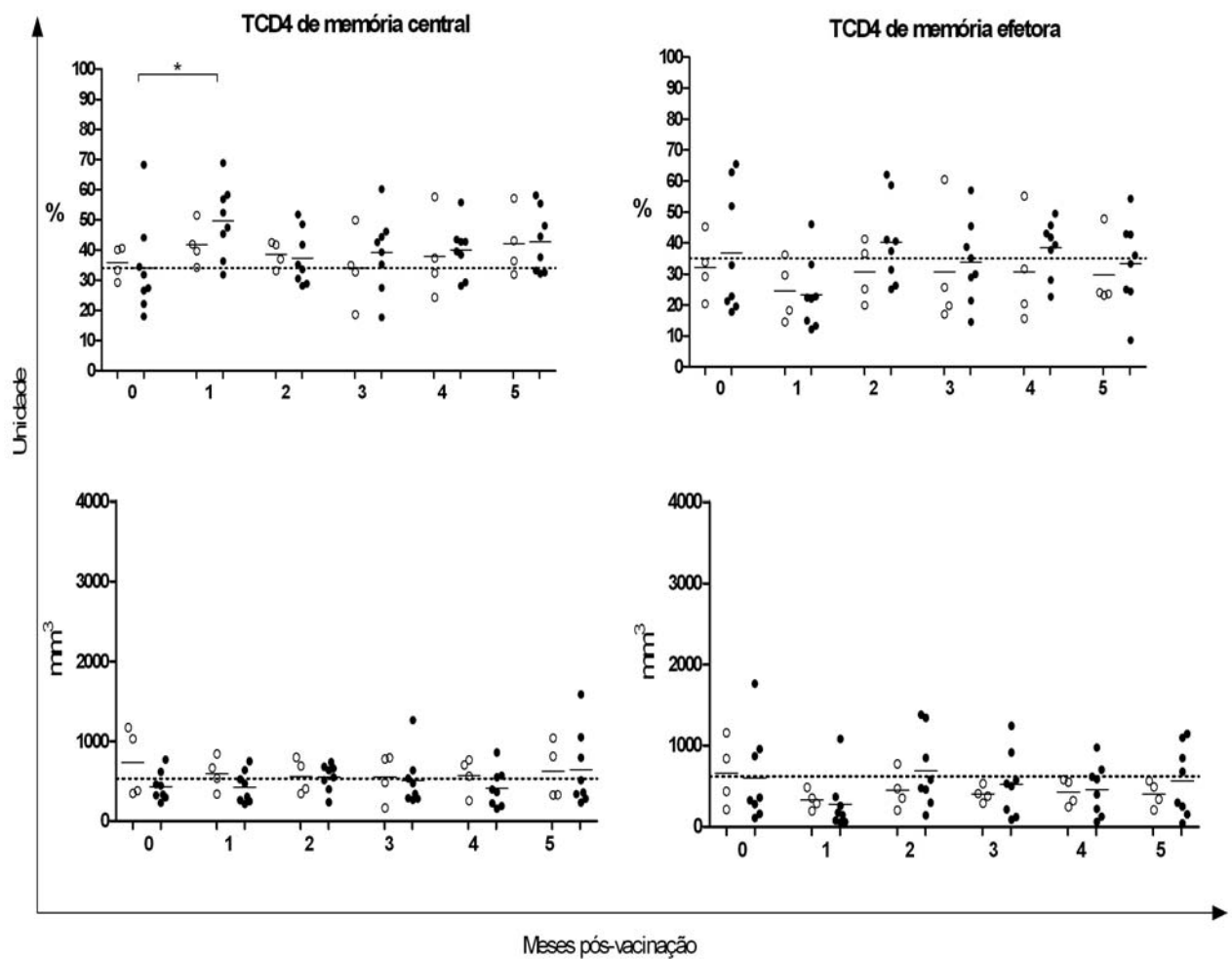


Figura 15: Cinética da avaliação de linfócitos TCD4 de memória central e memória efetora em valores percentuais (gráficos superiores) e valores absolutos (gráficos inferiores). Animais controle (n=4, branco) e animais vacinados (n=8, preto). A linha horizontal pontilhada representa a média de todos os animais no tempo zero. *Alteração significativa da média encontrada no grupo vacinado quando comparado ao mesmo grupo no tempo zero ($P < 0,05$ Wilcoxon Test).

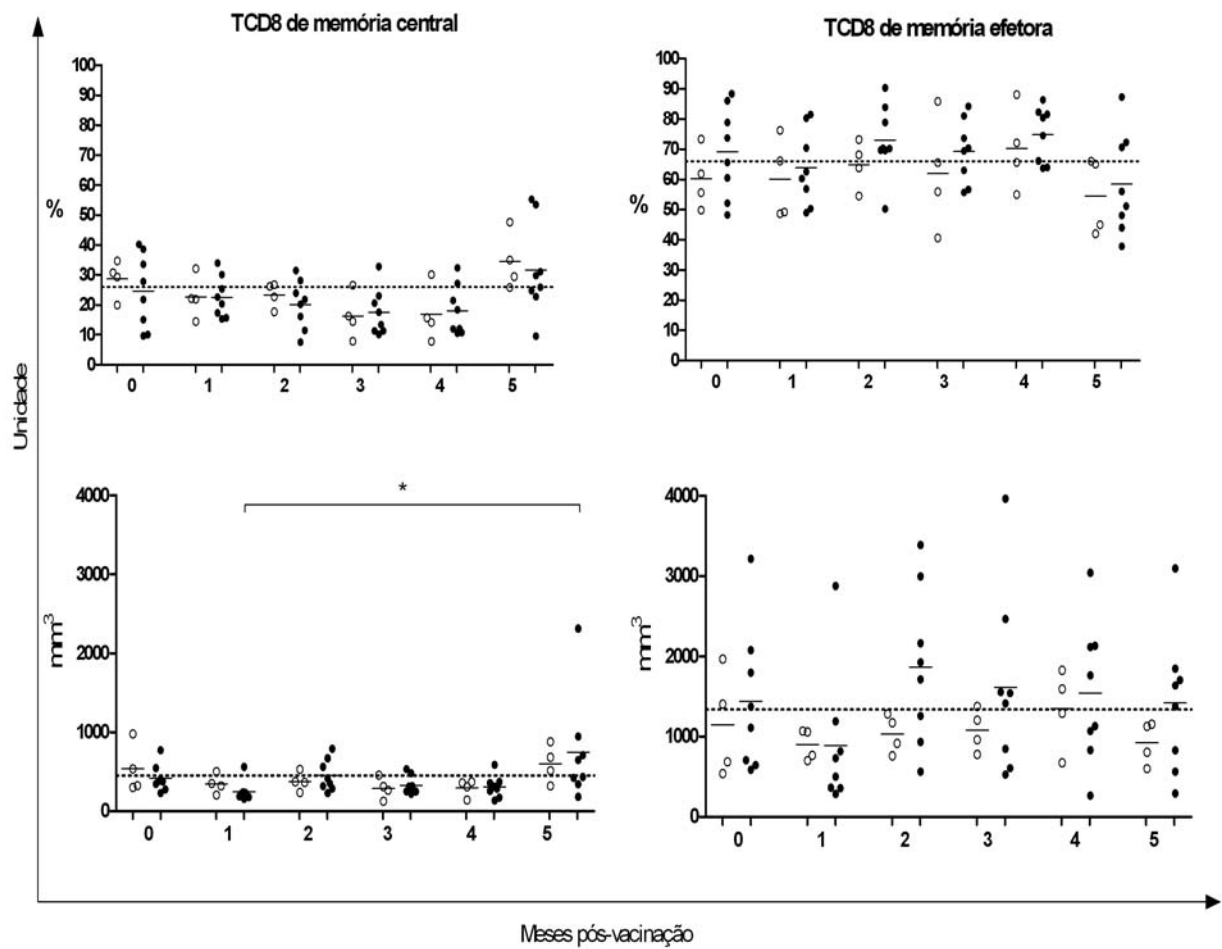


Figura 16: Cinética da avaliação de linfócitos TCD8 de memória central e memória efetora em valores percentuais (gráficos superiores) e valores absolutos (gráficos inferiores). Animais controle (n=4, branco) e animais vacinados (n=8, preto). A linha horizontal pontilhada representa a média de todos os animais no tempo zero. *Alteração significativa da média encontrada no grupo vacinado quando comparado ao mesmo grupo no tempo zero ($P < 0,05$ Wilcoxon Test).

Tabela 11: Cinética da avaliação dos valores percentuais e absolutos de células TCD4, TCD8 de memória central (MC) e memória efetora (ME) em macacos cynomolgus vacinados com pVAX-hsp65 (n=8) e animais controle (n=4).

		Tempo 0		1 mês		2 meses		3 meses		4 meses		5 meses	
		Controle	Vacinado	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado
%	TCD4 MC	35,82±5,49	34,11±15,94	41,86±7,215	49,69±12,08*	38,61±4,374	37,31±9,067	34,07±12,08	39,13±12,76	37,93±14,22	40,03±8,717	42,15±11	42,72±10,42
	TCD4 ME	32,16±10,36	36,82±20,14	24,65±10,04	23,34±11,43	30,75±9,917	40,32±13,76	30,77±20,14	33,9±13,44	30,75±17,62	38,49±8,984	29,67±12,11	33,40±14,07
	TCD8 MC	28,66±6,228	24,6±12,31	22,65±7,222	22,58±6,834	23,32±4,187	20,08±8,103	16,26±7,749	17,5±7,781	16,92±9,454	18,06±8,314	34,45±9,584	31,57±15,52
	TCD8 ME	60,18±10,06	69,17±15,03	60,05±13,49	63,87±12,49	64,89±7,954	72,88±12,01	62±18,94	69,25±10,45	70,19±13,83	74,86±9,102	54,51±12,77	58,4±16,77
mm ³	TCD4 MC	731,3±429,1	433,3±181,5	593,9±213,3	424,6±199,9	5579±220	550,8±167	553,7±295,7	509,3±333	571,8±227	412,2±237,9	624,2±356,7	642,7±473,7
	TCD4 ME	663,2±421,4	603,6±562,8	330,7±121,3	278±343	450,4±241	690,6±461,8	403,4±100,8	523,5±401,1	425,7±165,4	461,7±315,9	401±159,9	564,5±435
	TCD8 MC	533,6±314,5	415±172,6	342,9±121,3	248,8±129,6	375,3±119	450,8±200,5	289,1±135,9	325,9±115,4	293,7±105,4	307,2±139,5	598±238,6	748,4±675,5*
	TCD8 ME	1149±662,9	1439±901,6	898,5±192,1	890,2±858,6	1033±239,1	1868±975,3	1080±265,2	1615±1138	1346±500,1	1544±887,3	921,9±266,8	1419±884,5

* Análises estatisticamente significativa com $p < 0,05$ (*Wilcoxon Test*) – comparação com o dia zero.
MC – células de memória central; ME – células de memória efetora.

4.4.3 - Avaliação de marcador de ativação celular HLA-DR

O marcador de ativação celular HLA-DR foi avaliado em linfócitos T CD4 e linfócitos B. A expressão de HLA-DR em células TCD4 aumentou no grupo vacinado quando comparamos o dia zero ao 2º mês/pv ($4,21 \pm 2,34\%$ e $5,79 \pm 2,69\%$, respectivamente, com $p=0,02$). Da mesma forma, podemos encontrar diferenças estatisticamente significantes nos valores absolutos das células TCD4 expressando HLA-DR quando comparamos o dia zero ao 2º mês/pv ($70,99 \pm 77\%$ e $97,66 \pm 77\%$, respectivamente, com $p=0,05$). Não foi possível encontrar alterações no percentual e número absoluto de linfócitos B expressando HLA-DR (figura17) (tabela 12).

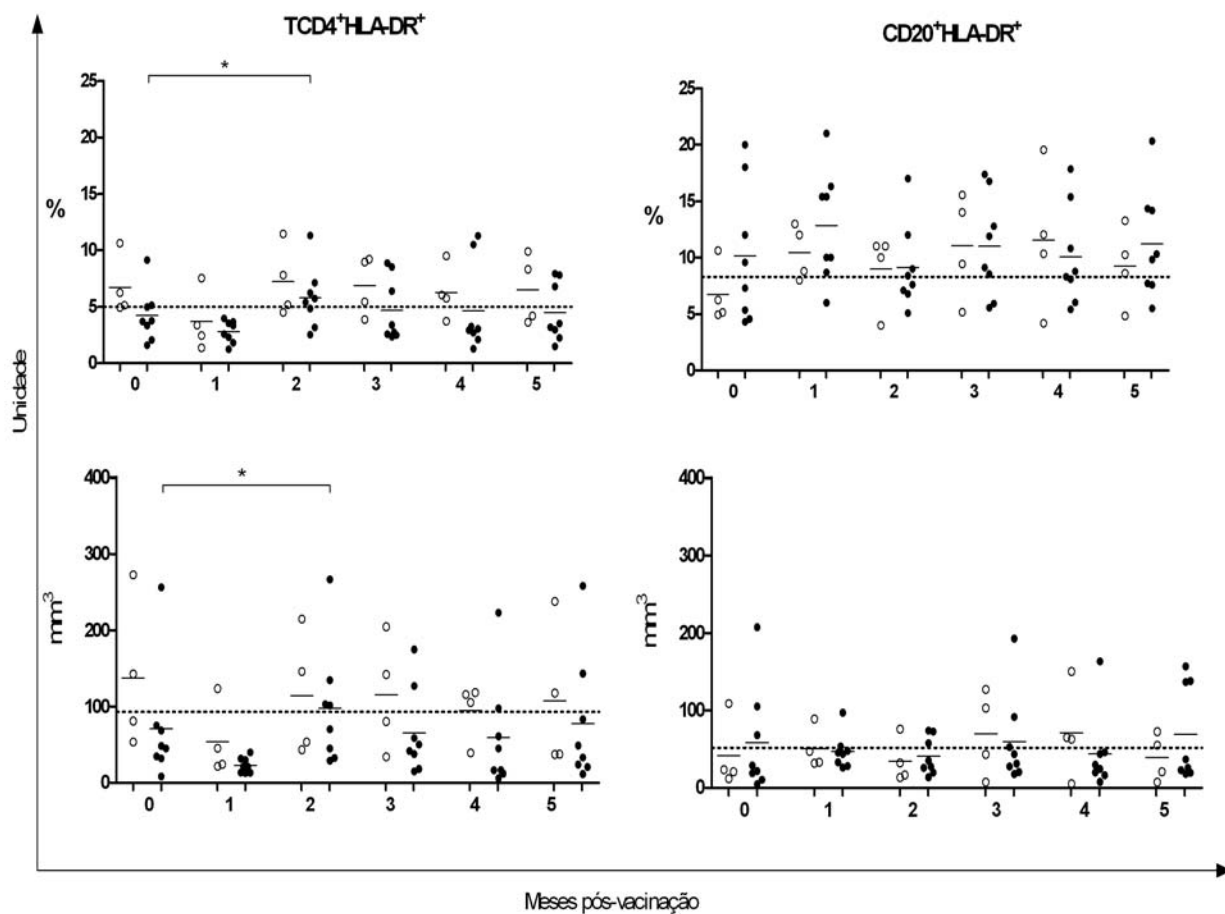


Figura 17: Cinética da avaliação de linfócitos TCD4 e linfócitos B expressando a molécula HLA-DR em valores percentuais (gráficos superiores) e valores absolutos (gráficos inferiores). Animais controle (n=4, branco) e animais vacinados (n=8, preto). A linha horizontal pontilhada representa a média de todos os animais no tempo zero. *Alteração significativa da média encontrada no grupo vacinado quando comparado ao mesmo grupo no tempo zero ($P < 0,05$ Wilcoxon Test).

4.4.4 - Avaliação de células dendríticas mielóide e plasmocitoide

As células dendríticas (DC) foram caracterizadas por Lin⁻ (CD3⁻/CD14⁻/CD16⁻/CD20⁻) HLA-DR, CD11c e CD123. As DC foram subdivididas nos dois tipos: as mielóide - mDC (Lin⁻, HLA-DR⁺/CD11c⁺/CD123⁻) e plasmocitoide - pDC (Lin⁻, HLA-DR⁺/CD11c⁻/CD123⁺) (figura18). Não encontramos diferenças no percentual e número absoluto das células mDC, porém, houve um aumento do percentual de células pDC quando comparamos o dia zero aos 2^o e 3^o meses/p.v (0,56±0,27%; 0,59±0,29%; 1,68±1,79%, respectivamente com $p=0,02$ e $p=0,008$). Do mesmo modo, podemos observar um aumento do número absoluto de células pDC do dia zero para o 3^o mês/p.v (31,12±15,9% e 61,21±24%, respectivamente com $p=0.02$).

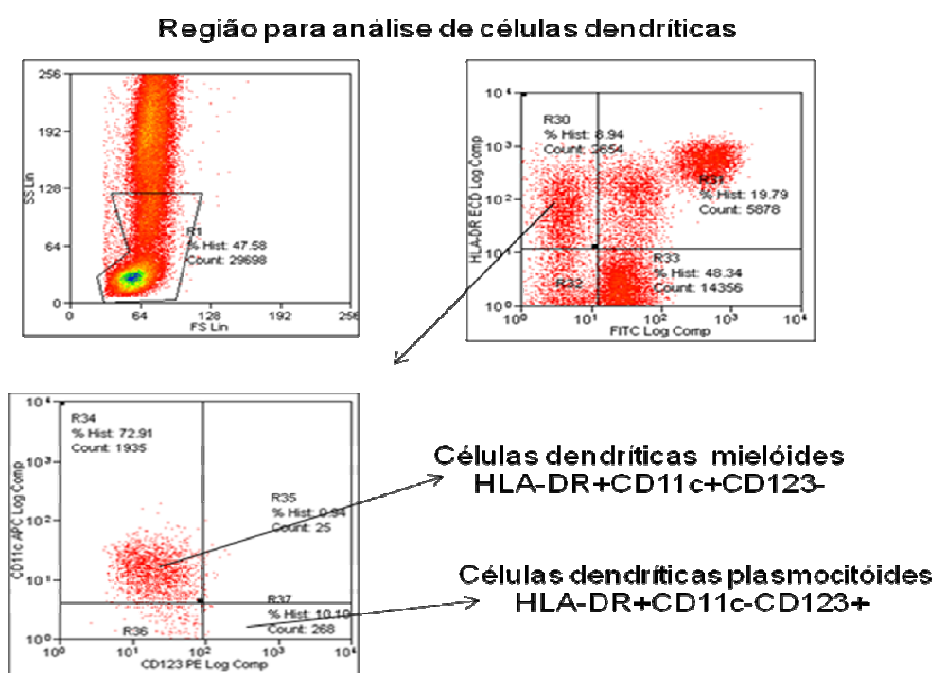


Figura 18: Paineis da análise de citometria de fluxo. Figuras representativas da avaliação de células mDC (Lin⁻, HLA-DR⁺/CD11c⁺/CD123⁻) e pDC (HLA-DR⁺/CD11c⁻/CD123⁺).

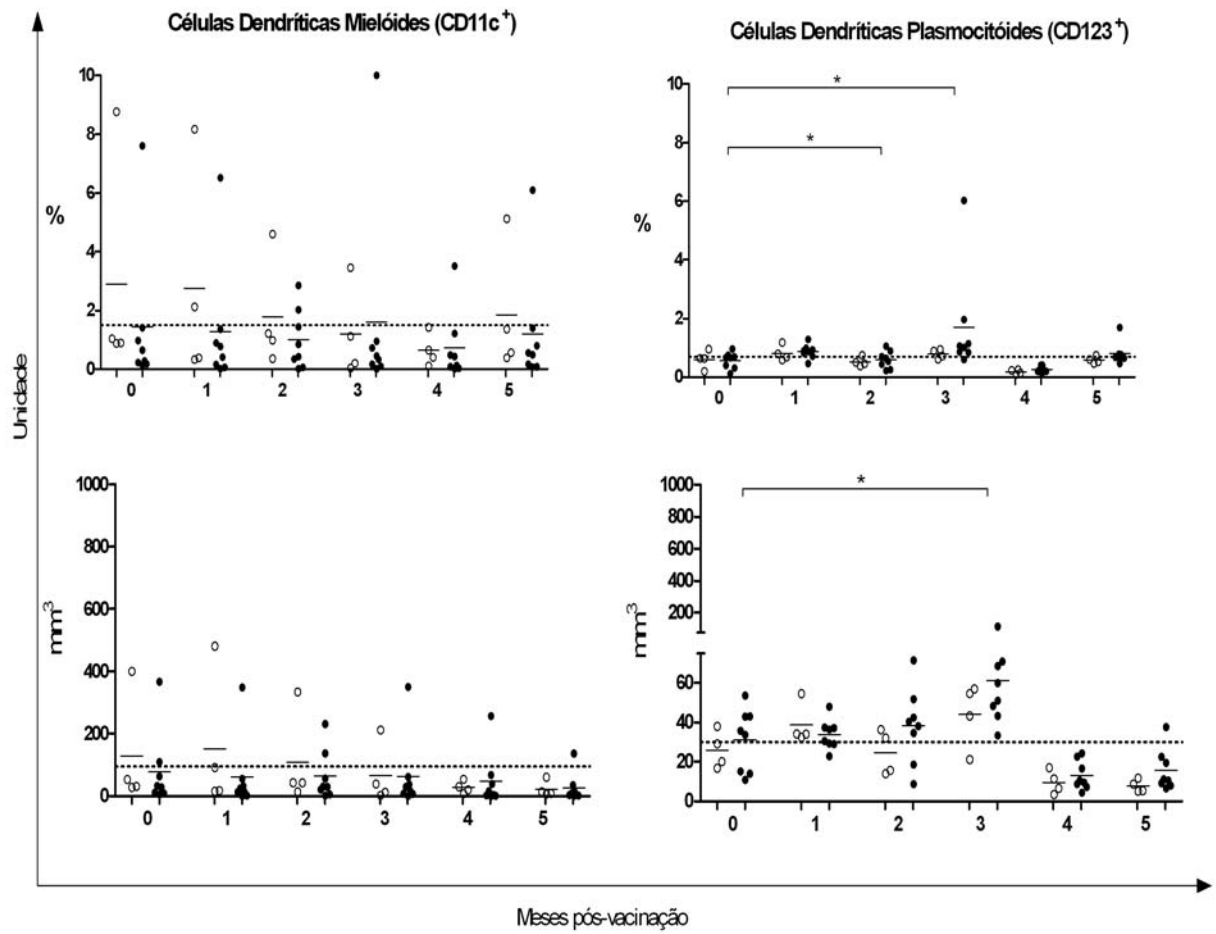


Figura 19: Cinética da avaliação de células dendríticas mielóides e plasmocitóides em valores percentuais (gráficos superiores) e valores absolutos (gráficos inferiores). Animais controle (n=4, branco) e animais vacinados (n=8, preto). A linha horizontal pontilhada representa a média de todos os animais no tempo zero. *Alteração significativa da média encontrada no grupo vacinado quando comparado ao mesmo grupo no tempo zero ($P < 0,05$ Wilcoxon Test).

Tabela 12: Cinética da avaliação dos valores percentuais e absolutos de células TCD4 e linfócitos B expressand HLA-DR e de células dendríticas mielóides (mDC) e plasmocitoide (pDC) em macacos cynomolgus vacinados com pVAX-hsp65 (n=8) e animais controle (n=4).

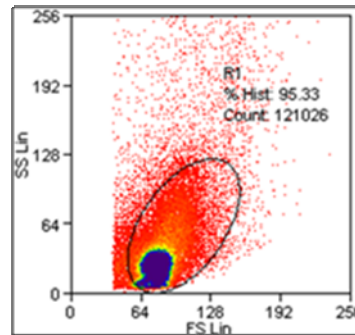
	Tempo 0		1 mês		2 meses		3 meses		4 meses		5 meses		
	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado	
%	TCD4/HLA-DR	6,73±2,65	4,21±2,34	3,69±2,70	2,81±0,970	7,23±3,15	5,79±2,69*	6,87±2,64	4,67±2,81	6,26±2,40	4,64±3,91	6,51±3,07	4,50±2,58
	CD20/HLA-DR	6,73±2,65	10,14±6,08	10,4±2,42	12,8±4,95	9,0±3,36	9,12±3,75	11,04±4,69	11±4,51	11,53±6,32	10,08±4,40	9,24±3,51	11,22±4,81
	mDC (CD11c+)	2,89±3,91	1,43±2,53	2,75±3,70	1,27±2,17	1,79±1,90	1,0±1,02	1,20±1,57	1,59±3,41	0,64±0,56	0,73±1,19	1,85±2,21	1,20±2,02
	pDC (CD123+)	0,60±0,31	0,56±0,27	0,80±0,26	0,87±0,23	0,51±0,15	0,59±0,29*	0,78±0,15	1,68±1,79*	0,17±0,075	0,26±0,10	0,58±0,12	0,79±0,37
mm ³	TCD4/HLA-DR	137,4±97	70,99±77	53,65±47	22,84±9	114,3±81	97,66±77*	115,3±74	65,38±56	94,55±37	59,61±72	107,5±94	77,79±84
	CD20/HLA-DR	41,39±45	58,24±69	50,38±26	46,91±22	34,53±28	40,75±23	70,28±54	59,82±58	71,05±59	43,94±49	38,99±30	69,42±62
	mDC (CD11c+)	128,2±181	77,96±121	151,5±222	61,03±117	108,1±151	64,03±80	66,28±98	63,59±117	27,96±19	48,39±87	22,05±25	25,42±46
	pDC (CD123+)	25,99±9,57	31,12±15,95	38,81±10,52	33,86±7,628	24,53±11,32	38,28±19,19	44,0±16,3	61,21±24,8*	9,60±5,92	13,03±7,36	7,783±3,13	15,66±10

* Análises estatisticamente significativa com $p < 0,05$ (*Wilcoxon Test*) – comparação com o dia zero.
mDC – células dendríticas mielóides; pDC – células dendríticas mielóides.

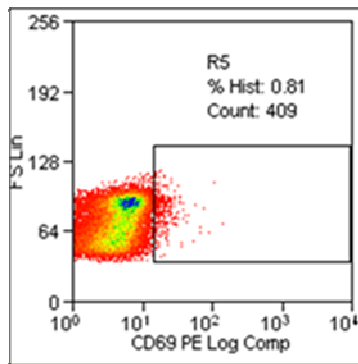
4.5- AVALIAÇÃO DE MARCADORES INTRACELULARES

A análise de marcadores intracelulares foi realizada no dia zero, e após o 2^o, 4^o e 6^o meses/p.v. devido ao volume de sangue periférico necessário para o experimento, o que poderia acarretar alterações hematológicas nos animais. As células periféricas foram estimuladas com um conjunto de peptídeos de HSP65 e os resultados estão expressos em relação a subtração dos valores basais das culturas celulares sem o estímulo específico. A análise está representada pelas figuras 20 e 21 e os dados percentuais na tabela 13.

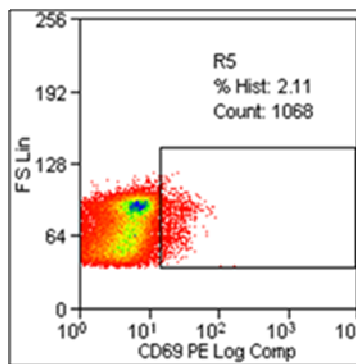
Região para análise de marcadores intracelulares



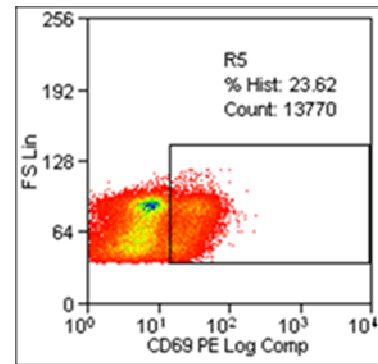
Análise da expressão de CD69



RPMI

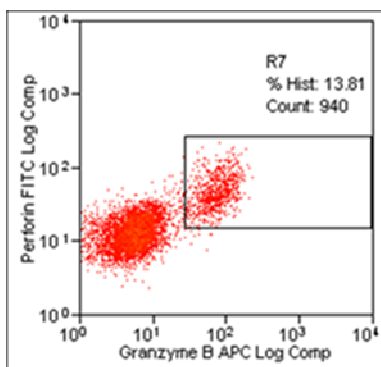


HSP-65

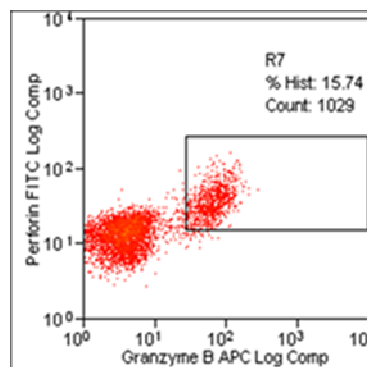


SEB/A

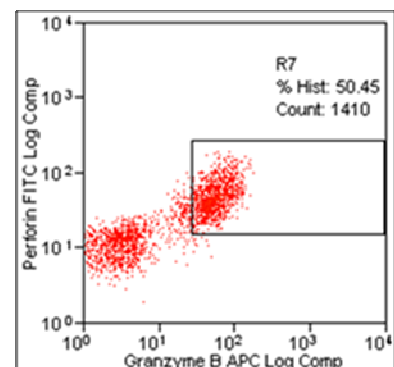
Análise da expressão de Granzima B/Perforina



RPMI



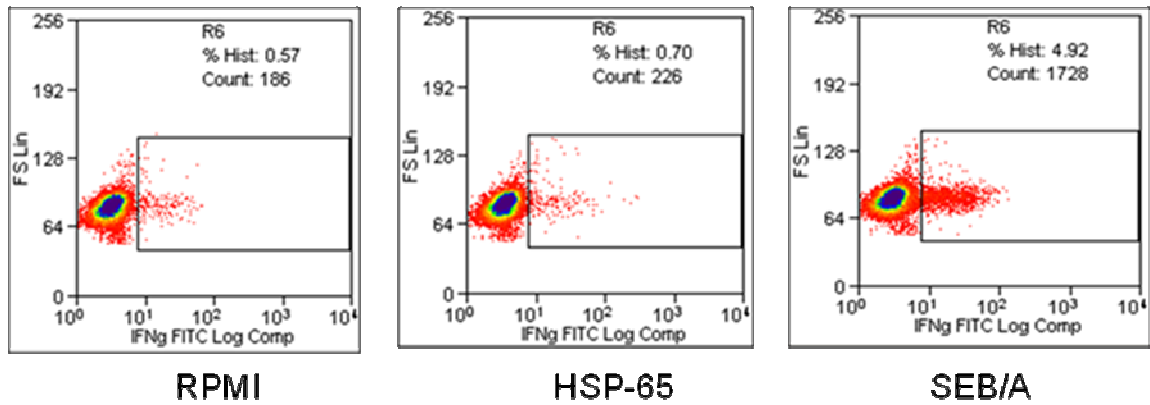
HSP-65



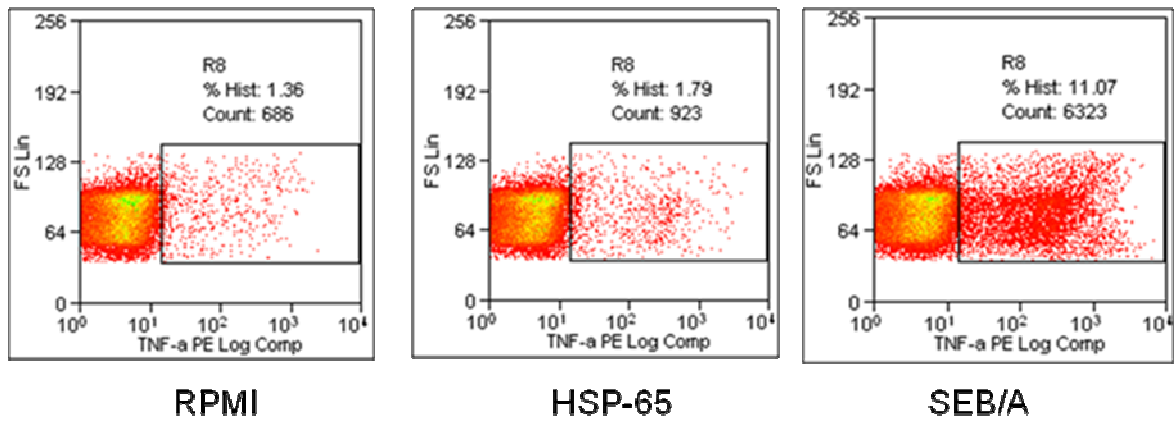
SEB/A

Figura 20: Paineis da análise de citometria de fluxo. Figuras representativas da avaliação de células TCD4, TCD8 e linfócitos B expressando o marcador CD69 e avaliação de células TCD8 e NK expressando granzimaB/perforina. Os painéis representam a análise de controle negativo (RPMI), estímulo específico com a HSP-65 e controle positivo (SEB/A). Cerca de 100mil células foram lidas na região R1.

Análise da expressão de IFN- γ



Análise da expressão de TNF- α



Análise da expressão de IL-12 em monócitos

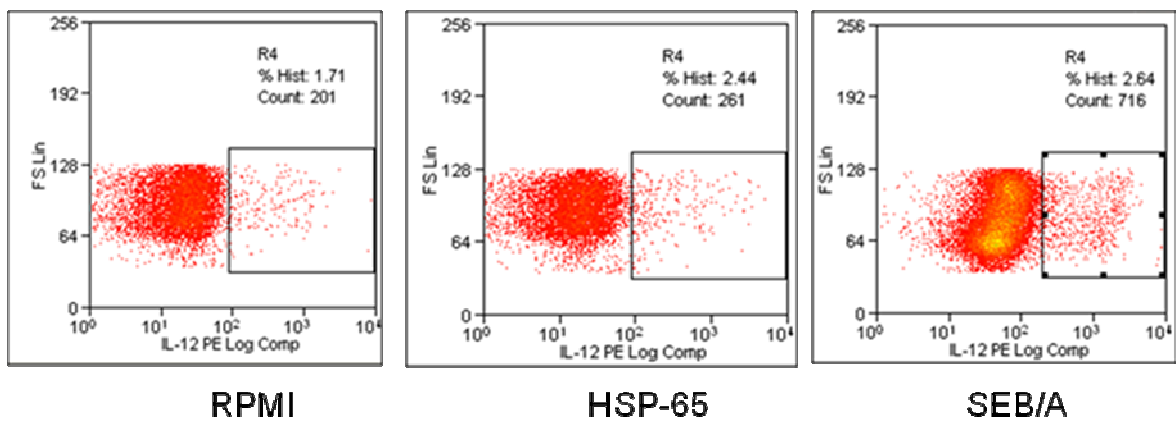


Figura 21: Paineis de análise de citometria de fluxo. Figuras representativas da avaliação de células TCD4, TCD8 e NK expressando a citocina IFN- γ ; avaliação de células TCD8 e TCD4 e NK expressando a citocina TNF- α e a expressão da citocina IL-12 em monócitos. Os painéis representam a análise de controle negativo (RPMI), estímulo específico com a HSP-65 e controle positivo (SEB/A). Cerca de 100mil células foram lidas na região R1.

4.5.1 – Avaliação de marcador de ativação celular CD69.

O marcador de ativação celular CD69 foi avaliado em linfócitos T CD4, CD8 e B estimulados com o pool de peptídeos da HSP65. A expressão de CD69 estava ligeiramente aumentada nos linfócitos TCD4⁺ e B no 4^o mês/p.v., mas sem diferença estatística ($p>0,05$). Apesar disso, 5 dos 8 animais vacinados apresentaram níveis elevados de células T CD4⁺ expressando este marcador de ativação celular. Em células TCD8⁺ e B, respectivamente 2 e 4 dos 8 animais expressaram CD69⁺, sem diferença estatística entre os grupos vacinados e não vacinados. Um animal do grupo vacinado com pVAX-hsp65 (animal M1) apresentou os maiores níveis desta molécula tanto em células TCD4⁺, TCD8⁺ e B e outro animal (P7) em células TCD4⁺ e B (figura 22).

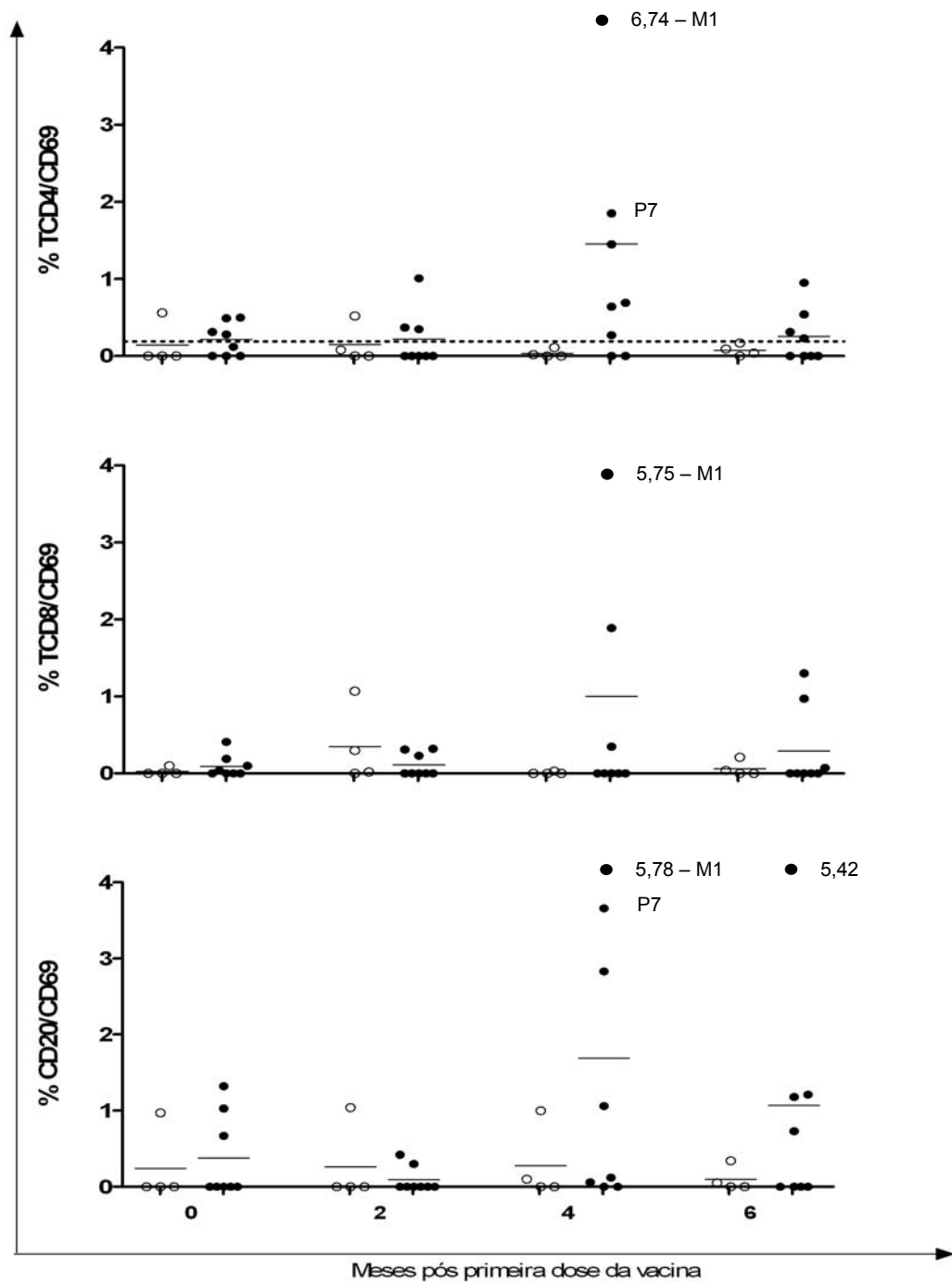


Figura 22: Avaliação do marcador de ativação celular CD69 em linfócitos TCD4, TCD8 e B. Os valores percentuais dos animais que expressaram esta molécula acima de 4% foram representados e seus valores reais ao lado. Animais controle (n=4, branco) e animais vacinados (n=8, preto). A linha horizontal representa a média de cada grupo e a linha horizontal pontilhada representa a média de todos os animais no tempo zero.

4.5.3 – Avaliação da cinética do perfil de citocinas intracelulares por citometria de fluxo em macacos cynomolgus vacinados com pVax-hsp65 por eletroporação.

A expressão das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-12 e IL-10 foi avaliada por citometria de fluxo. Para tanto, quatro análises foram realizadas: uma antes da vacinação (dia 0), uma após a segunda dose (2^o mes) e duas após a terceira dose da vacina (4^o e 6^o meses/p.v).

A expressão de IFN- γ foi analisada em linfócitos TCD4, TCD8 e células NK. Quando comparamos as médias da produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺ não evidenciamos diferença entre os animais vacinados com pVAX hsp65 e os animais do grupo controle nos diferentes tempos. No entanto, houve uma tendência de aumento na expressão desta citocina no grupo experimental quando comparado ao controle nos 2^o e 4^o meses/p.v. ($p = 0,06$). Estes resultados mostram uma tendência à produção de IFN- γ específica para HSP65 em linfócitos T CD4.

Em relação à expressão desta citocina em linfócitos TCD8⁺, não houve aumento da expressão de IFN- γ quando estimulados pelo antígeno HSP65 ($p > 0,05$) em nenhum dos tempos analisados. No entanto, foi observado um aumento significativo na produção desta citocina em células NK no 6^o mês/p.v. (dia zero= $0,17 \pm 0,26\%$ vs $0,75 \pm 0,79\%$; $p = 0,04$), mas não nos demais tempos avaliados (figura 24).

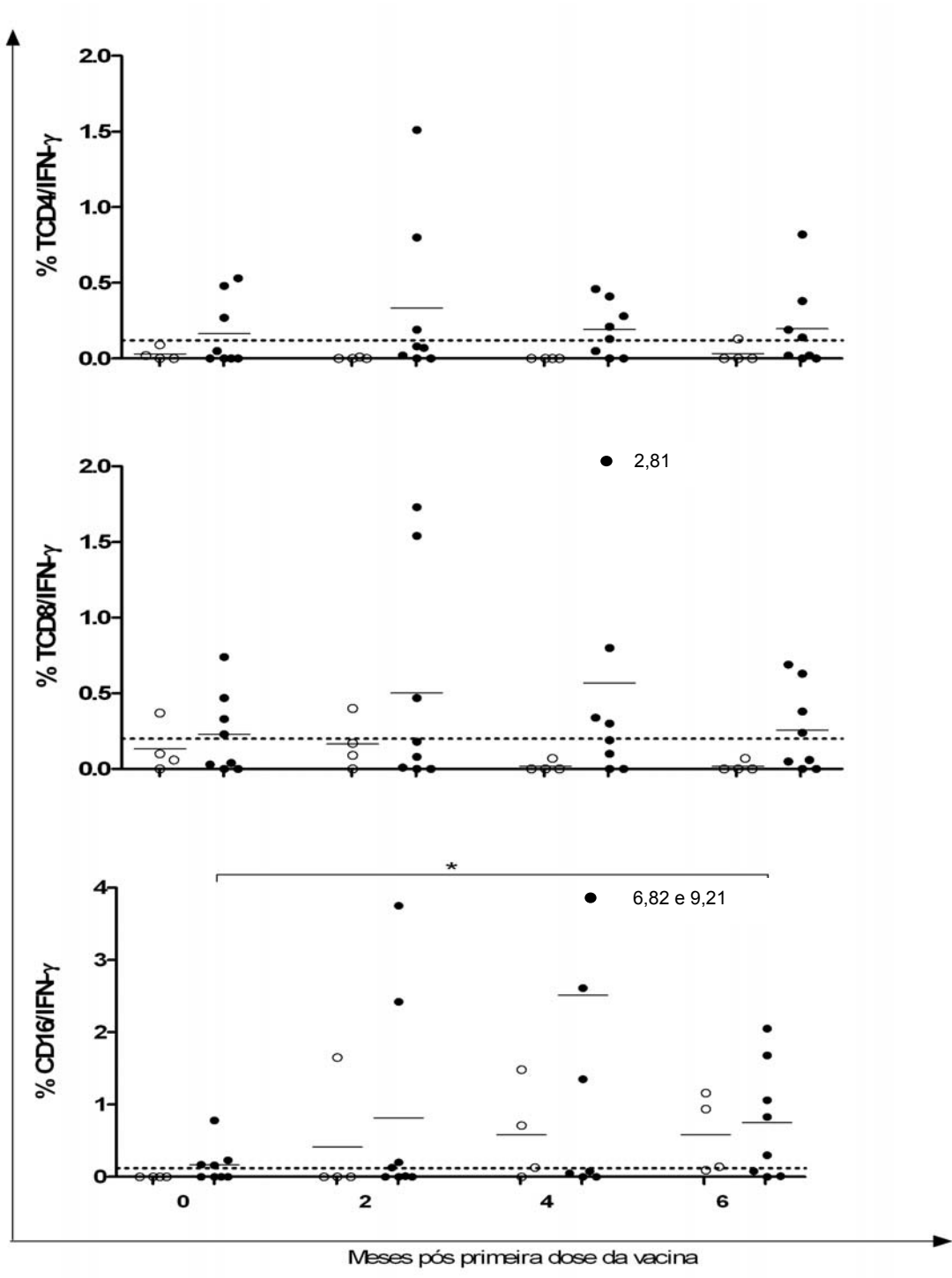


Figura 24: Avaliação da expressão da citocina IFN- γ em células TCD4, TCD8 e NK. Os valores percentuais dos animais que expressaram esta molécula acima de 2% (TCD4 e TCD8) e 4% (NK) foram representados e seus valores reais ao lado. Animais controle (n=4, branco) e animais vacinados (n=8, preto). A linha horizontal pontilhada representa a média de todos os animais no tempo zero. *Alteração significativa da média encontrada no grupo vacinado quando comparado ao mesmo grupo no tempo zero ($P < 0,05$ Wilcoxon Test).

Da mesma forma que IFN- γ , a expressão de TNF- α foi avaliada em linfócitos TCD4, TCD8 e células NK, bem como em linfócitos B. Ao analisar a expressão de TNF- α em linfócitos TCD4, observou-se um aumento após o 2^o mês/p.v. ($0,019 \pm 0,35\%$ vs $0,33 \pm 0,53\%$; $p=0,03$). Este aumento foi mais acentuado após o 4^o mês/p.v., correspondendo ao período após a terceira dose da vacina ($0,019 \pm 0,35\%$ vs $0,48 \pm 0,54\%$; $p = 0,03$). Apesar de não evidenciada diferença estatística para o 6^o mês/p.v., 4 dos 8 animais expressavam TNF- α específico para HSP65 em linfócitos TCD4.

Em relação aos linfócitos TCD8, não houve diferença estatística, no entanto houve uma tendência ao aumento no grupo experimental em relação ao tempo zero no 6^o mês/p.v ($p = 0,06$), sendo, esta citocina, expressa em 5 dos 8 animais vacinados. Ao avaliar a expressão desta citocina em células NK, observou-se um aumento significativo somente no 6^o mês/p.v ($0,001 \pm 0,003\%$ vs $2,15 \pm 2,27\%$; $p = 0,03$) (figura 25).

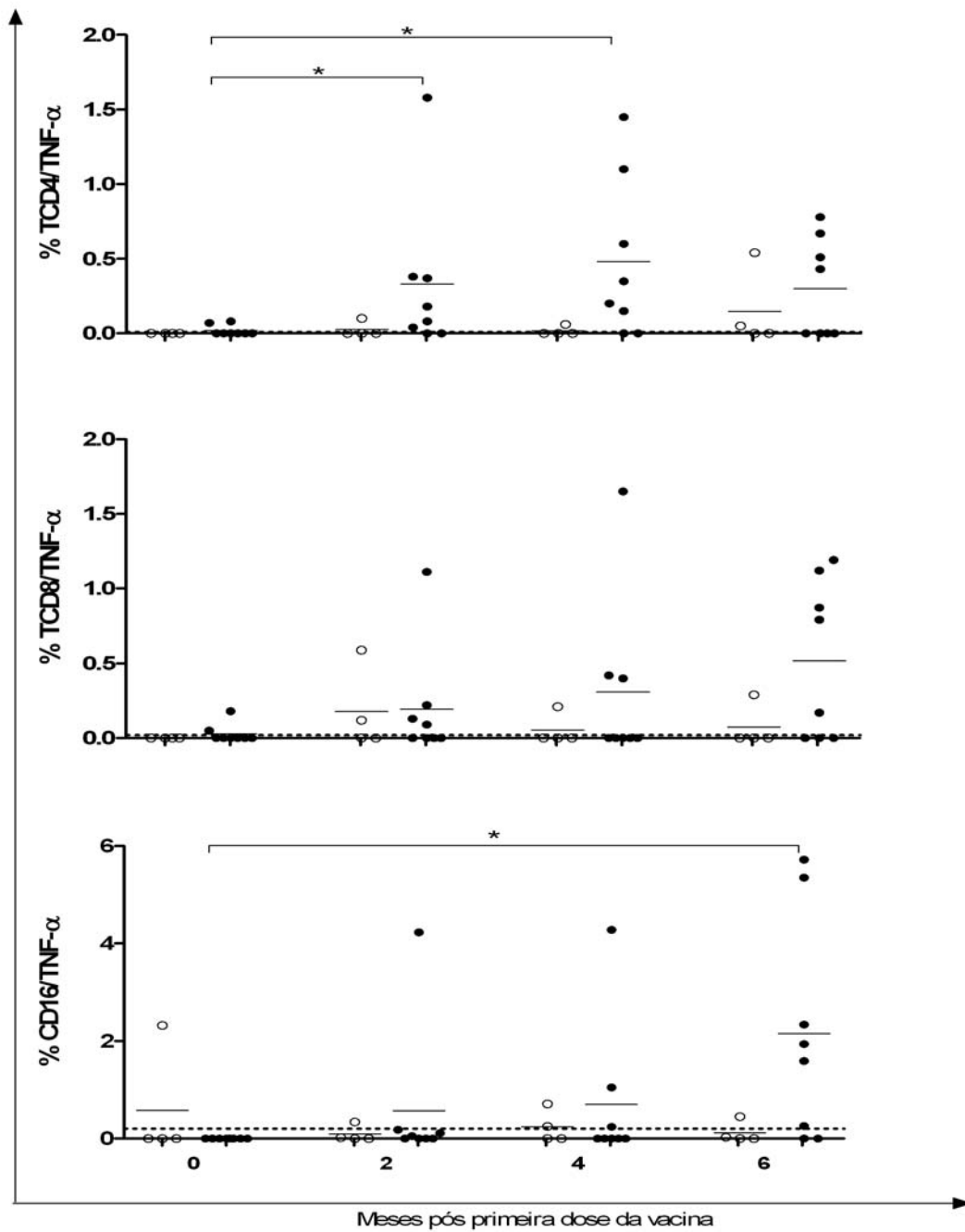


Figura 25: Avaliação da expressão da citocina TNF- α em células TCD4, TCD8 e NK. Animais controle (n=4, branco) e animais vacinados (n=8, preto). a linha horizontal pontilhada representa a média de todos os animais no tempo zero. *Alteração significativa da média encontrada no grupo vacinado quando comparado ao mesmo grupo no tempo zero ($P < 0,05$ Wilcoxon Test).

A expressão de IL-12 foi observada em monócitos (CD14⁺) e não apresentou nenhuma diferença estatística em todos os tempos observados ($p > 0,05$), apesar de termos 5 a 6 animais expressando esta citocina durante a vacinação (figura 26). A expressão de IL-10 foi avaliada em linfócitos TCD4, TCD8 e células NK, onde não foi possível observar mudanças significativas em ambas as populações celulares em todos os tempos estudados ($p > 0,05$) (figura26).

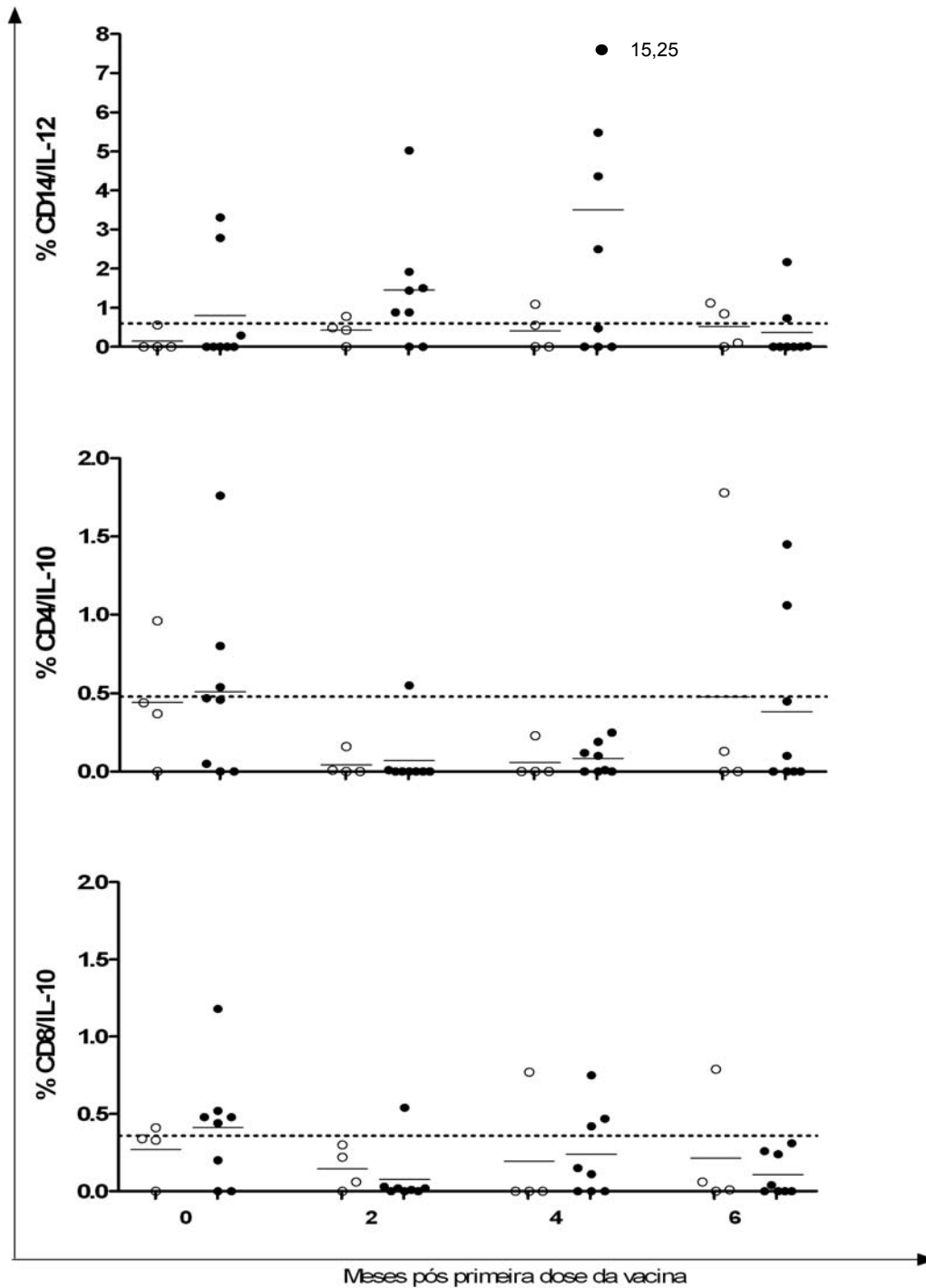


Figura 26: Avaliação da expressão das citocinas IL-12 em monócitos e IL-10 em células TCD4 e TCD8. Animais controle (n=4, branco) e animais vacinados (n=8, preto). Os valores percentuais dos animais que expressaram IL-12 acima de 8% foram representados e seus valores reais ao lado. A linha horizontal pontilhada representa a média de todos os animais no tempo zero.

4.5.4 Avaliação da expressão do marcador ki67, indicador de proliferação celular.

A identificação de células em estágio de diferenciação foi determinado em linfócitos TCD4, TCD8 e linfócitos B após estímulo com os peptídeos de HSP65. Em relação aos linfócitos TCD4 não foi evidenciada nenhuma alteração ao longo do esquema vacinal, com tendência ($p=0,06$) a diminuição identificada no 6^o mês/p.v. ($0,30\pm 0,39\%$) quando os níveis do dia zero ($0,86\pm 0,61\%$). As células TCD8+ apresentaram ligeira diminuição em sua atividade proliferativa no 4^o mês/p.v. ($0,21\pm 0,27\%$) em relação ao dia zero ($0,64\pm 0,42\%$, $p=0,03$). Um aumento na expressão de Ki67 foi observado nas células B quando grupo controle ($0,24\pm 0,48\%$) e vacinado ($2,40\pm 2,18\%$) foram analisados ($p=0,03$) no 4^o mês/p.v. (figura 27).

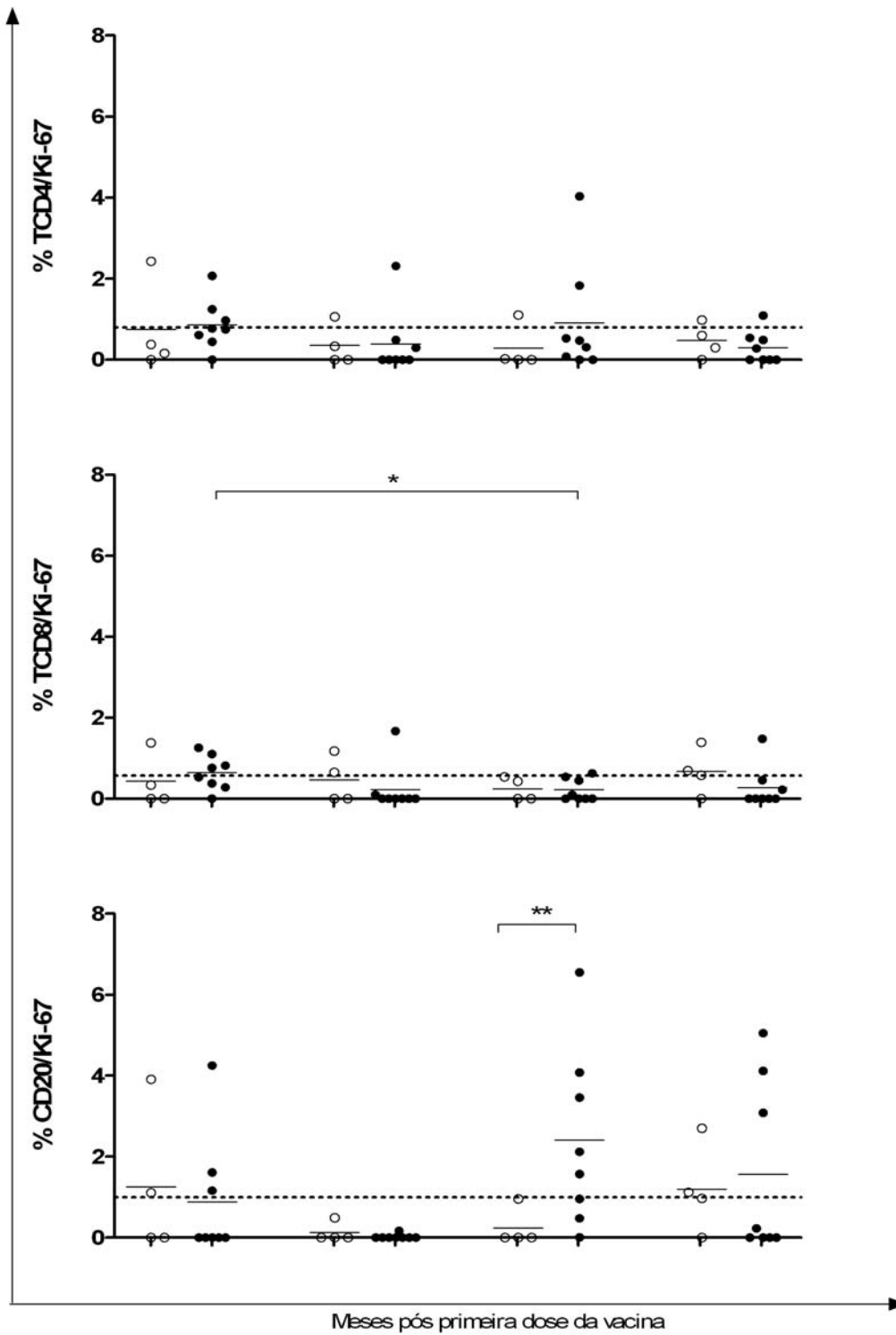


Figura 27: Avaliação da expressão de KI-67 em células TCD4, TCD8 e linfócitos B. Animais controle (n=4, branco) e animais vacinados (n=8, preto). A linha horizontal representa a média de cada grupo. A linha horizontal pontilhada representa a média de todos os animais no tempo zero. *Alteração significativa da média encontrada no grupo vacinado quando comparado ao mesmo grupo no tempo zero ($P < 0,05$ Wilcoxon Test). **Alteração significativa da média encontrada entre o grupo controle e vacinado ($P < 0,05$ Mann-Whitney Test).

4.5.5 Avaliação da expressão do marcador antiapoptótico Bcl-2.

A avaliação do marcador antiapoptótico foi realizada em células TCD4 e TCD8 com estímulo específico da proteína HSP-65 (tabela 13). Não foram encontradas alterações nos percentuais de células TCD4 expressando esta molécula ao longo do período estudado. No entanto, houve um aumento significativo da expressão desta molécula em células TD8 quando comparamos o dia zero ao 6º mês/p.v. ($0,18 \pm 0,5\%$ e $2,93 \pm 3,74\%$, respectivamente, com $p=0,03$) (figura 28).

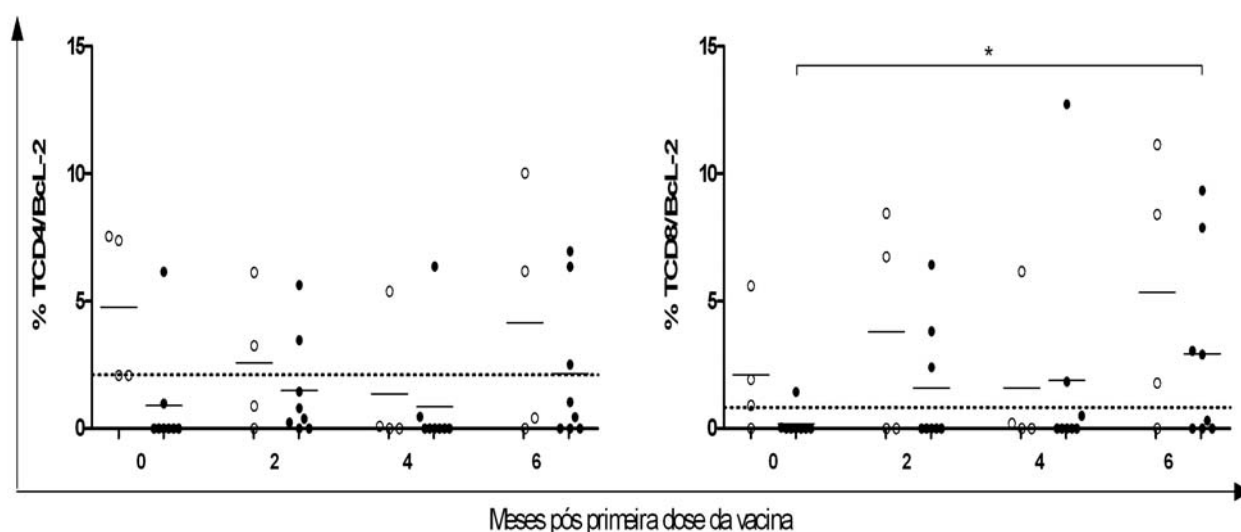


Figura 28: Avaliação da expressão do marcador antiapoptótico Bcl-2 em células TCD4 e TCD8. Animais controle (n=4, branco) e animais vacinados (n=8, preto). A linha horizontal representa a média de cada grupo e a linha horizontal pontilhada representa a média de todos os animais no tempo zero. *Alteração significativa da média encontrada no grupo vacinado quando comparado ao mesmo grupo no tempo zero ($P<0,05$ Wilcoxon Test).

Tabela 13 Cinética da avaliação dos valores percentuais de marcadores intracelulares em macacos cynomolgus vacinados com pVAX-hsp65 (n=8) e animais controle (n=4).

Marcação	Tempo 0		Tempo 2		p valor		Tempo 4		p valor		Tempo 6		p valor	
	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado	pariado	pariado	Controle	Vacinado	pariado	pariado	Controle	Vacinado	pariado	pariado
CD4 CD69	0,14 ± 0,28	0,21 ± 0,21	0,15 ± 0,25	0,22 ± 0,36	0,81	0,93	0,03 ± 0,05	1,45 ± 2,23	0,15	0,10	0,07 ± 0,07	0,25 ± 0,34	0,70	0,79
CD8 CD69	0,02 ± 0,05	0,09 ± 0,14	0,35 ± 0,50	0,11 ± 0,15	1,00	0,37	0,01 ± 0,01	1,00 ± 2,02	0,69	0,54	0,06 ± 0,10	0,29 ± 0,53	0,81	0,93
CD20 CD69	0,24 ± 0,48	0,38 ± 0,55	0,26 ± 0,52	0,09 ± 0,17	0,37	0,91	0,27 ± 0,49	1,69 ± 2,18	0,16	0,26	0,10 ± 0,16	1,07 ± 1,83	0,19	0,52
CD16 Granz Perf	0,39 ± 0,79	0,16 ± 0,43	0,002 ± 0,005	2,67 ± 3,74	0,08	0,15	0,38 ± 0,45	2,92 ± 5,51	0,62	0,93	0,60 ± 0,92	5,86 ± 6,79	0,12	0,53
CD8 Granz Perf	4,94 ± 2,89	2,53 ± 2,65	1,32 ± 1,53	2,53 ± 6,63	0,44	0,48	0,50 ± 0,99	1,70 ± 2,03	0,69	0,39	0,58 ± 1,00	3,15 ± 4,76	0,69	0,92
CD4 IFN	0,03 ± 0,04	0,17 ± 0,23	0,003 ± 0,005	0,33 ± 0,54	0,81	0,06	0,003 ± 0,005	0,19 ± 0,18	0,84	0,06	0,03 ± 0,06	0,20 ± 0,28	1,00	0,13
CD8 IFN	0,13 ± 0,16	0,23 ± 0,27	0,16 ± 0,17	0,50 ± 0,72	0,69	0,80	0,02 ± 0,03	0,57 ± 0,94	0,84	0,06	0,02 ± 0,03	0,26 ± 0,28	0,94	0,13
CD16 IFN	0,002 ± 0,005	0,17 ± 0,26	0,41 ± 0,82	0,81 ± 1,45	0,81	0,36	0,58 ± 0,68	2,51 ± 3,57	0,16	0,79	0,58 ± 0,55	0,75 ± 0,79	0,04*	0,93
CD4 TNF	0,002 ± 0,005	0,019 ± 0,35	0,02 ± 0,05	0,33 ± 0,53	0,03*	0,13	0,01 ± 0,03	0,48 ± 0,54	0,03*	0,06	0,15 ± 0,27	0,30 ± 0,33	0,10	0,79
CD8 TNF	0,002 ± 0,005	0,03 ± 0,06	0,18 ± 0,28	0,19 ± 0,38	0,31	0,91	0,05 ± 0,10	0,31 ± 0,57	0,25	0,93	0,07 ± 0,14	0,52 ± 0,53	0,06	0,54
CD16 TNF	0,58 ± 1,16	0,001 ± 0,003	0,09 ± 0,17	0,57 ± 1,48	0,12	0,93	0,24 ± 0,33	0,70 ± 1,49	0,25	0,92	0,12 ± 0,22	2,15 ± 2,27	0,03*	0,14
CD20 TNF	0,01 ± 0,01	0,24 ± 0,52	0,01 ± 0,01	0,27 ± 0,75	1,00	1,00	0,02 ± 0,05	0,41 ± 1,11	1,00	0,91	0,92 ± 0,70	3,24 ± 5,60	0,09	0,73
CD4 IL-10	0,44 ± 0,39	0,51 ± 0,58	0,04 ± 0,08	0,07 ± 0,19	0,15	0,54	0,06 ± 0,11	0,08 ± 0,09	0,11	0,47	0,48 ± 0,87	0,38 ± 0,57	0,81	0,93
CD8 IL-10	0,27 ± 0,18	0,41 ± 0,38	0,14 ± 0,14	0,08 ± 0,19	0,20	0,30	0,19 ± 0,38	0,24 ± 0,28	0,55	0,59	0,21 ± 0,38	0,11 ± 0,14	0,08	0,66
CD14 IL-12	0,14 ± 0,28	0,80 ± 1,4	0,42 ± 0,32	1,45 ± 1,60	0,56	0,14	0,41 ± 0,52	3,51 ± 5,20	0,16	0,43	0,52 ± 0,55	0,36 ± 0,77	0,81	0,80
CD4 Ki-67	0,74 ± 1,14	0,86 ± 0,61	0,35 ± 0,49	0,39 ± 0,79	0,22	0,78	0,28 ± 0,55	0,91 ± 1,39	0,81	0,34	0,47 ± 0,42	0,30 ± 0,39	0,06	0,43
CD8 Ki-67	0,43 ± 0,65	0,64 ± 0,42	0,46 ± 0,57	0,22 ± 0,59	0,22	0,48	0,24 ± 0,28	0,21 ± 0,27	0,03*	1,00	0,67 ± 0,57	0,27 ± 0,52	0,08	0,20
CD20 Ki-67	1,25 ± 1,85	0,88 ± 1,50	0,12 ± 0,24	0,02 ± 0,06	0,25	0,60	0,24 ± 0,48	2,40 ± 2,18	0,19	0,03*	1,20 ± 1,12	1,56 ± 2,16	0,62	0,93
CD4 BcL-2	4,81±3,10	0,89±2,15	2,61±2,72	1,52±2,0	0,22	0,55	1,42±2,70	0,92±2,20	1,00	0,61	4,12±4,81	2,20±2,92	0,31	0,73
CD8 BcL-2	2,11±2,46	0,18±0,51	3,79±4,43	1,58±2,44	0,25	0,39	1,59±3,05	1,88±4,42	0,44	0,92	5,33±2,29	2,93±3,74	0,03*	0,55

Análises estatisticamente significativa com $p < 0,05$ para análises pareadas (*Wilcoxon Test*) – comparação com o dia zero. E $p < 0,05$ para análise não pareada (*Mann Whitney test*) – comparação entre grupo vacinado e controle no mesmo tempo.

4.5.6 - Avaliação do perfil de citocinas Th1/Th2 em macacos vacinados com cynomolgus hsp65 pVax por eletroporação

A expressão das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5 e IL-6 foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando o *non-human Primate cytokine kit* Th1/Th2 (BD). Da mesma forma, como analisado no tópico anterior, quatro testes de citocinas foram realizados: um antes da vacinação (tempo 0), um após a segunda dose (2^o mês) e dois após a terceira dose da vacina (4^o e 6^o meses p.v.) (tabela 14).

A produção de TNF- α após a estimulação com HSP65 foi aumentada significativamente no grupo vacinado quando comparado o dia zero (1,14 \pm 3,23 pg/mL) e o 4^o mês p.v. (44,32 \pm 48,47 pg/mL; $p = 0,031$), como demonstrado na figura 29. No entanto, esses valores retornaram a normalidade após o 6^o mês/p.v. A produção de IL-6 foi marcadamente elevada após o 4^o mês/p.v. (53,5 \pm 54,3 pg/mL) quando comparada ao dia zero (2,4 \pm 5,7; $p = 0,015$).

Não foi encontrada diferença estatística em relação à expressão das demais citocinas Th1 (IFN- γ e IL-2) e Th2 (IL4 e IL-5) em todos os tempos estudados (figura 29).

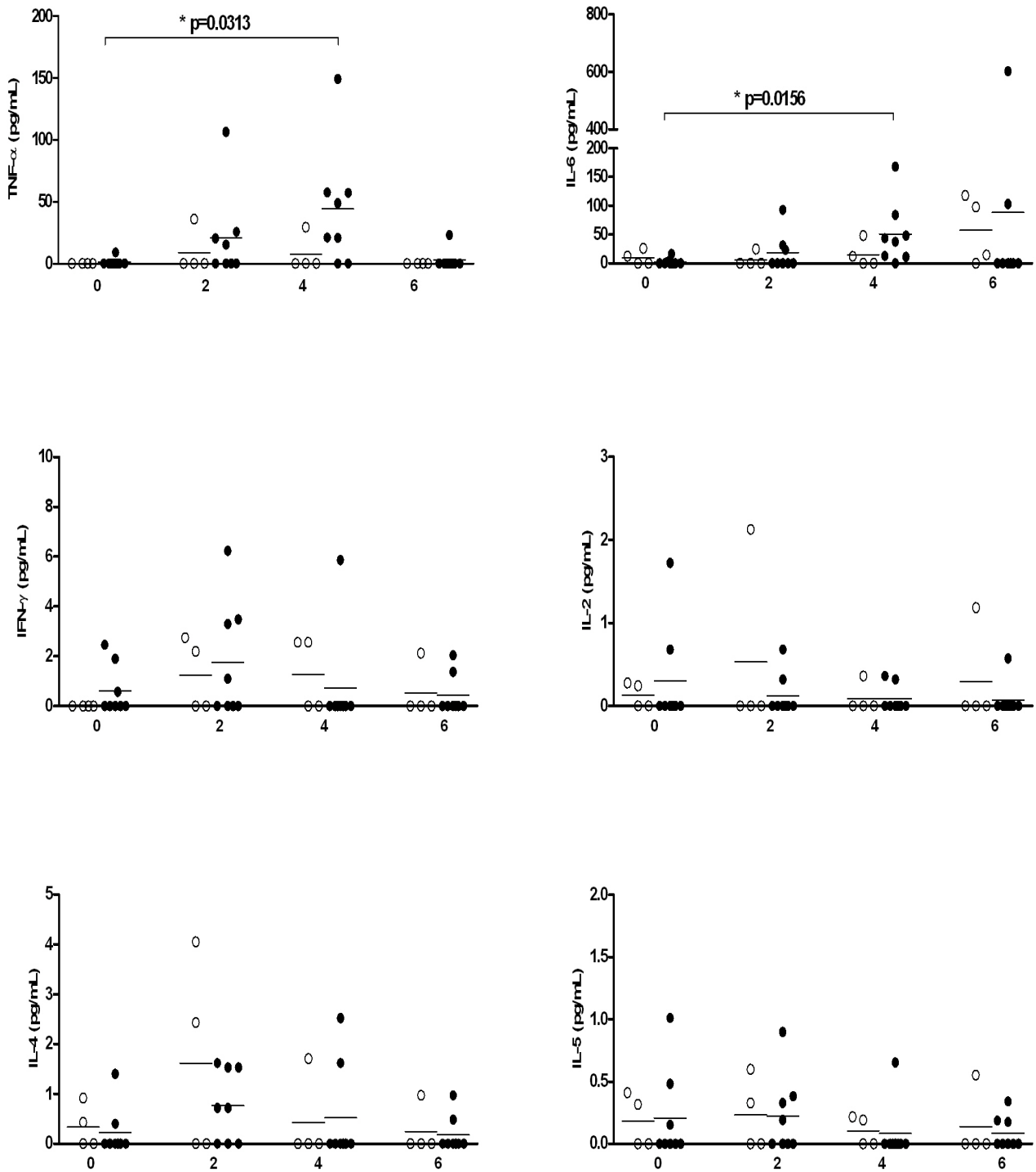


Figura 29: Avaliação da expressão das citocinas Th1/Th2: IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5 e IL-6 TNF- α no sobrenadante de cultura. Animais controle (n=4, branco) e animais vacinados (n=8, preto). A linha horizontal representa a média de cada grupo e a linha horizontal pontilhada representa a média de todos os animais no tempo zero. *Alteração significativa da média encontrada no grupo vacinado quando comparado ao mesmo grupo no tempo zero ($P < 0,05$ Wilcoxon Test). O eixo x representa os meses após primeira dose da vacina.

Tabela 14 Cinética da avaliação das citocinas Th1/Th2 em sobrenadante de cultura em macacos cynomolgus vacinados com pVAX-hsp65 (n=8) e animais controle (n=4).

Citocinas	Tempo 0		Tempo 2		Tempo 4		Tempo 6	
	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado	Controle	Vacinado
TNF-α	0,00 \pm 0,00	1,14 \pm 3,23	9,01 \pm 18,02	21,0 \pm 36,09	7,37 \pm 14,74	44,32 \pm 48,47*	0,00 \pm 0,00	2,87 \pm 8,13
IFN-g	0,00 \pm 0,00	0,61 \pm 0,99	1,24 \pm 1,44	1,76 \pm 2,33	1,28 \pm 1,48	0,73 \pm 2,07	0,53 \pm 1,06	0,43 \pm 0,81
IL-2	1,13 \pm 0,15	0,30 \pm 0,62	0,53 \pm 1,06	0,12 \pm 0,25	0,09 \pm 0,18	0,08 \pm 0,15	0,29 \pm 0,59	0,07 \pm 0,20
IL-6	9,66 \pm 12,46	2,38 \pm 5,70	6,19 \pm 12,39	18,48 \pm 32,61	15,02 \pm 22,74	53,53 \pm 54,26*	57,61 \pm 58,92	88,14 \pm 210,9
IL4	0,34 \pm 0,44	0,23 \pm 0,49	1,62 \pm 1,98	0,76 \pm 0,72	0,43 \pm 0,85	0,52 \pm 0,99	0,24 \pm 0,48	0,18 \pm 0,36
IL5	0,18 \pm 0,21	0,21 \pm 0,37	0,23 \pm 0,29	0,22 \pm 0,31	0,10 \pm 0,12	0,08 \pm 0,23	0,13 \pm 0,28	0,09 \pm 0,13

* Análises estatisticamente significativa com $p < 0,05$ (*Wilcoxon Test*) – comparação com o dia zero.

5-Discussão

5 - DISCUSSÃO

Após mais de 200 anos de desenvolvimento da primeira vacina contra a varíola em 1796, por Edward Jenner, o mundo se encontra frente a uma série de avanços científicos que tem permitido a produção de vacinas mais eficazes e seguras. No Brasil, histórias bem sucedidas de vacinação erradicaram a febre amarela urbana (1942) e a varíola (1973). A criação do Programa Nacional de Imunizações (PNI), em 1973, levou à erradicação da poliomielite em 1989, ao controle do sarampo, do tétano neonatal e acidental, das formas graves e infantis de tuberculose, da difteria e da coqueluche.

A vacinação representa uma das principais ferramentas para a prevenção das doenças. Uma delas, a BCG, tem sido utilizada contra a TB por mais de 90 anos, porém, ela não tem contribuído para uma significativa redução da incidência da doença em adultos. Assim, várias tentativas em desenvolver uma vacina candidata contra TB tem sido objeto de diferentes grupos, usando novas abordagens, como as vacinas de DNA. No andamento deste trabalho, avaliamos a segurança e a imunogenicidade da vacina pVAX-hsp65 administrava, em 3 doses, por via intramuscular, seguido do método de eletroporação em primatas não humanos (macacos cynomolgus).

Para a obtenção de bons resultados com as futuras vacinas, é fundamental que estas sejam de qualidade adequada e de segurança comprovada. É, portanto, indispensável uma criteriosa avaliação clínica e laboratorial em ensaios pré-clínicos

e clínicos, para a busca rigorosa do diagnóstico etiológico, com a finalidade de que o evento adverso, a seqüela ou mesmo o óbito não sejam atribuídos à vacina, sem fundamentação científica.

A diminuição das reações ou complicações pós-vacinais deve ser preocupação permanente e objeto de estudo de todos os responsáveis pelas imunizações, em todos os níveis. Novas vacinas, menos reatogênicas ou mais seguras, estão em desenvolvimento ou já aprovadas. A incorporação das mesmas à rotina das vacinações deve ser feita criteriosamente, levando-se em conta a avaliação de custo-benefício, a eficácia e a eficiência e o potencial de obter coberturas vacinais amplas.

A eletroporação vem emergindo como uma nova tecnologia para aumentar a eficácia de vacinas de DNA, e tem sido demonstrada que aumenta a eficácia destas vacinas de 10 a 1000 vezes (van Drunen Littel-van den Hurk & Hannaman, 2010; Sardesai & Weiner, 2011). Dados preliminares demonstraram, em ensaio clínico, que a eletroporação aumentou a resposta de células T anti-HIV1 (van Drunen Littel-van den Hurk & Hannaman, 2010), além disso, vem sendo evidenciado que eletroporação *in vivo* aumenta significativamente a imunogenicidade das vacinas de DNA pelo aumento eficiente da transfecção no DNA injetado (Mathiesen I, 1999; Widera *et. al.*, 2000) e o recrutamento de células do sistema imune como células dendríticas, linfócitos T e B para o sítio de imunização (Babiuk *et. al.*, 2004; Liu *et. al.*, 2008).

Este método estava sendo considerado como improvável em vacinas profiláticas, principalmente pela dor e desconforto provocado, sendo assim, deveria ser usada em contextos terapêuticos, incluindo vacinas contra o câncer. Porém, este quadro vem mudando. A análise da segurança da eletroporação com vacinas de

DNA foi vista em voluntários saudáveis por Vasan *et. al.*(2011), onde a primeira demonstração deste método para utilização em vacinação com DNA, em indivíduos, mostrou-se segura, tolerável, independente da idade, gênero, tamanho corporal ou sequência de vacinação. Ainda, segundo os voluntários, a intensidade da dor pós-eletroporação foi grande imediatamente após o estímulo elétrico, porém, a sensação melhora rapidamente em menos de 30min pós-vacinação. A maioria dos participantes (97%) relatou que se submeteria a este método de vacinação em vacinas contra HIV e ainda também (91%) para vacinas que já existem, como as da influenza.

Desta forma, avaliamos o protótipo vacina pVAX-hsp65 em macacos cynomolgus, inicialmente quanto a segurança da administração da vacina e do vetor pVAX (grupo controle) administradas por eletroporação. Neste estudo, não evidenciamos reações locais aparentes, em até seis meses pós-vacinação, como: eritema, edemas, úlceras e formação de quelóides; nem reações sistêmicas: febre, convulsões, vômitos, toxicidade hepática ou renal no grupo estudado. Os animais não demonstraram sinais de dor que foram acompanhados até 48h após o final da contenção química. Estes sinais podem variar individualmente, mas alguns parâmetros podem indicar sinais de dor nestes animais, como: mudança comportamental, agressividade e automutilação, que geralmente vem acompanhada de diminuição do apetite, depressão e apatia. As mudanças dependem e variam de acordo com o nível da dor, da tolerância do animal, das condições em que a dor ocorre, entre outros fatores. Contudo, vale ressaltar que os animais foram previamente contidos com um fármaco dissociativo de ação rápida, e não demonstraram qualquer sinal de dor após o efeito do sedativo, indicando que a vacina pode ser segura e tolerável.

A avaliação dos eventos adversos de forma sistêmica advindos de vacinas candidatas inclui a mensuração dos parâmetros hematológicos e de dados bioquímicos importantes. Os animais foram acompanhados por seis meses pós-vacinação e estes dados foram comparados com os animais antes da vacinação (tempo zero) e comparados com o grupo controle. Assim sendo, em nosso estudo, a cinética dos valores observados para hemácias, hemoglobina, volume globular médio, concentração de hemoglobina globular média e contagem de leucócitos totais, se mantiveram constantes, sem alterações estatísticas significantes. Porém, somente o hematócrito do grupo vacinado aumentou no 6º mês de análise em relação aos valores basais destes mesmos animais no tempo zero, mas não em relação aos animais do grupo controle. Este aumento não pode ser considerado importante, pois está ainda dentro da faixa de normalidade para estes animais (análises prévias realizadas até 36 meses antes da vacinação mostram variações da ordem de 34,7 a 45,6%). Há poucos relatos na literatura sobre valores de normalidade de hematócrito em macacos *cynomolgus*. Nossos dados mostram-se ligeiramente aumentados em relação aos animais da colônia de primatas do Cecal/Fiocruz (Andrade *et al.*, 2004), porém, dentro dos parâmetros encontrado por Schuurman & Smith (2005). Da mesma forma, apesar de encontrarmos uma diminuição significativa do número de plaquetas nos animais vacinados, este dado não tem significância clínica, uma vez que esta diminuição não caracterizou uma trombocitopenia e esteve de acordo com a média encontrada para estes animais nas nossas análises pré-clínicas. Deste modo, acreditamos que todos os animais foram considerados saudáveis quanto ao exame hematológico.

No teste de função renal, foram avaliadas as dosagens de creatinina e ureia. Os animais vacinados com pVAX-hsp65 apresentaram um aumento no nível sérico

de uréia nos 3º, 4º e 5º meses do estudo, no entanto, este parâmetro sozinho, não pode indicar uma disfunção renal, pois sua concentração sanguínea pode sofrer influência de fatores extra-renais como aumento do catabolismo protéico. Bush (1994) relatou que resultados encontrados acima de 210mg/dL, podem ser considerados críticos, levando em consideração a possibilidade de algum tipo de insuficiência renal. Porém, os animais vacinados apresentavam valores dentro da faixa de normalidade para a espécie, segundo dados pré-vacinais e dados da literatura (Andrade et. al., 2004). Além disso, a diminuição significativa das enzimas para análise da função hepática, ALT e AST, no grupo de animais vacinados com pVAX-hsp65, evidencia uma característica importante do não desenvolvimento de uma hepatotoxicidade pós-vacinação, demonstrando a segurança sistêmica desta formulação vacinal.

Embora seja amplamente aceito que as células TCD4⁺ desempenham um papel essencial na capacidade, tanto de seres humanos quanto em animais, de resistência à infecção pelo *M. tuberculosis* (Boom et.al., 2003), muitos estudos *in vivo* e *in vitro* forneceram evidências da atuação expressiva de linfócitos T CD8 para o controle da doença (van Pinxteren et. al., 2000; Turner et. al., 2001; Urdahl et. al., 2003). Em nosso estudo, os animais apresentaram um aumento, mesmo que transiente, de linfócitos TCD8 no 2º mês pós termino das três doses de pVAX-hsp65. Este dado é interessante pela importância destas células para a imunidade contra o *M. tuberculosis*, pois possuem funções efetoras incluindo, produção de citocinas, granulisimas e atividade citolítica (Murray et. al., 2006; Woodworth et al., 2006). Chen et. al (2009), evidenciaram que a depleção de linfócitos TCD8 em macacos rhesus, vacinados com a BCG, levou a um decréscimo na imunidade contra a TB induzida pela vacina. E ainda, que a depleção deste tipo celular neste modelo

animal, previamente infectados com *M. tuberculosis* e curados com terapia antituberculostática, também resultou em diminuição da resposta protetora fazendo com que estes animais fossem reinfectados.

Observamos um aumento das células TCD4 de memória central (MC) e tendência à diminuição das células TCD4 de memória efetora (ME), indicando que estas últimas poderiam migrar para os tecidos periféricos, muito possivelmente para os pulmões. A identificação de células MC e ME em primatas não humanos ainda não é completamente caracterizada e não identificamos publicações que avaliem tais subpopulações em primatas não humanos infectados pelo *M. tuberculosis* ou mesmo em testes de vacinas. Contudo, Orme (2010), descreveu a existência de uma diminuição de células T de memória central durante a infecção experimental em camundongos com *M. tuberculosis* ou durante a vacinação com a BCG. De forma contrária, durante a vacinação com a vacina de subunidade ESAT-6/Ag85B (Lindenstron *et al.*, 2009) ou com o *M. tuberculosis* atenuado pela depleção do gene *PhoP* foi evidenciado aumento no número de células MC no pulmão de camundongos. Acredita-se que a presença de células de memórias central seja um indicador da persistência da resposta imune e eficácia para a vacinação. Em estudo com seres humanos, a identificação de células T de memória central e efetora é realizada pela identificação dos marcadores como CD27, CD57 e CD45RO. Sabemos que utilizamos marcadores distintos aos utilizados em seres humanos, seguindo publicação prévia (Jankovic *et al.*, 2003) que não nos permitem com clareza avaliar o *homing* destas células para linfonodos e/ou tecidos periféricos. Como a experimentação foi concluída após 6 meses da primeira dose vacinal não podemos avaliar se a resposta induzida será de longa duração.

As células dendríticas (DC) são componentes importantes da resposta imune inata e adaptativa e podem produzir altos níveis de TNF- α e IL-12 após infecção com *M. tuberculosis in vitro* (Mihret *et al.*, 2011). Duas subpopulações de DC são descritas: mielóides (mDC) e plasmocitóides (pDC). As mDC são populações de células imaturas no tecido periférico e migram para os linfonodos pelos vasos linfáticos aferentes. Em contrapartida, as pDC migram diretamente do sangue para os linfonodos através de vênulas (Wilson *et al.*, 2003). As pDC são conhecidas pela sua capacidade de produzir altos níveis de IFN- α e β (Ito *et al.*, 2006). Além disso, estas células também podem produzir citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 (Jego *et al.*, 2003). Em nosso estudo houve um aumento no percentual de pDC nos 2º e 3º meses/p.v e nos valores absoluto no 3º mês/p.v em macacos cynomolgus vacinados com pVAX-hsp65. Estudos sugerem que a contagem de pDC pode ser utilizada como valor preditivo de doenças como a infecção pelo vírus da dengue ou no sucesso do tratamento contra o *M. tuberculosis* (Hosmalin *et al.*, 2008). Acreditamos que o aumento das pDC induzida pela vacinação com pVAX-hsp65 possa vir direcionar, após infecção natural por *M. tuberculosis*, as DC para os linfonodos e pulmões, órgãos choques para a replicação micobacteriana e, assim, facilitar a apresentação antigênica e induzir resposta de células T específicas.

A identificação de marcadores de ativação em linfócitos pode ter um papel importante em doenças inflamatórias (Miki-Hosokawa *et al.*, 2009). A presença do marcador CD69 em tuberculose pode ser um indicador de sensibilização a infecção pelo *M. tuberculosis* (Avgustin *et al.*, 2005), contudo, não se sabe seu papel exato no processo inflamatório e na tuberculose. Li *et al.* (2011) descreveram que a presença de células TCD4⁺/CD69⁺ em pacientes com TB são em, sua maioria, células produtoras de IFN- γ . Em nosso estudo observamos um aumento relativo de

células TCD4⁺, CD8⁺ e também em células B que expressavam CD69⁺, em parte dos animais vacinados após 4^o mês/p.v., mas sem diferenças estatísticas. Sabemos que o uso de primatas não humanos para testagem de novos protótipos vacinais são importantes e possivelmente o número limitado de animais possa justificar esta diferença na resposta observada. Porém, há relatos de um modesto aumento em células expressando marcadores CD69⁺ em sangue periférico, mas com significativo aumento em células pulmonares em cynomolgus infectados pelo *M. tuberculosis* (Lin *et al.*, 2006). Não foi possível no presente estudo avaliarmos células alveolares. Recentemente, Li e *et. al.* (2011) demonstram que células TCD4⁺/CD69⁺ podem ser marcadores de células Th1 polifuncionais específicas para o *M. tuberculosis*, quando isoladas de líquido pleural de pacientes com TB. Mais uma vez, estas células possuem papel fundamental na produção de IFN- γ nos sítios da infecção pelo *M. tuberculosis*. De modo inverso, há poucos relatos sobre o papel das células TCD8⁺/CD69⁺ em relação à infecção pelo *M. tuberculosis*. Nossos resultados apontam para uma modesta elevação no número de animais apresentando esta população celular. Antas *et al.*, apontam que em indivíduos com TB latente (PPD positivos) há uma elevação do número de CD8⁺/CD69⁺ quando células periféricas são estimuladas com antígenos micobacterianos.

O anticorpo monoclonal Ki-67 detecta uma proteína nuclear e está presente em células ativadas, mas não em células quiescentes (Gerdes *at al.*, 1991). Este marcador tem sido muito utilizado para o estudo da biologia do câncer e indica a proliferação de células tumorais (Gerdes, 1990; Scholzen & Gerdes, 2000). Esta proteína é expressa durante toda fase ativa da divisão celular e sua expressão intracelular tem sido utilizada para mensurar respostas de células T específicas induzidas por vacinação (Stubbe *et al.*, 2006; Cellera *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2008)

ou o *turnover* destas células em indivíduos com infecções virais crônicas, como a infecção pelo HIV (Sachsenberg *et al.*, 1998; Doisne *et al.*, 2004). Em nosso estudo, encontramos um aumento de linfócitos B proliferando no 4º mês/p.v., quando comparamos o grupo controle e o vacinado. Da mesma forma, os linfócitos B foram identificados como apresentadoras de antígenos micobacterianos e capazes de gerar células T de memória e ativar células TCD8 com atividade citotóxica, em modelo murino vacinado com pcDNA-Hsp65, induzindo, assim, o controle micobacteriano (Almeida *et al.*, 2011). Estas células podem ser importantes para a indução de resposta celular protetora na tuberculose, além de seu papel clássico na produção de anticorpos na resposta humoral.

A citocina do tipo Th1 IFN- γ , produzida por células TCD4⁺, TCD8⁺, NK e NKT durante a resposta imune à infecção por *M. tuberculosis*, é de grande importância na defesa contra microrganismos intracelulares, pois leva à ativação e promoção dos mecanismos de defesa que controlam o crescimento micobacteriano (Nathan *et al.*, 1984), além disso, o IFN- γ leva a ativação da produção de óxido nítrico sintase que limita o crescimento micobacteriano (Hayashi *et al.*, 2001). Por outro lado, respostas do tipo Th2, caracterizadas pela secreção de citocinas como IL-4 e IL-5, estão associadas com a falta de proteção ao *M. tuberculosis* e estão correlacionadas com o aumento da suscetibilidade à doença (Bai *et al.*, 2004; Rook, 2007). Em nosso estudo, tanto as células TCD4⁺ quanto TCD8⁺ antígeno-específicas para a HSP65 tiveram uma tendência ao aumento da produção de IFN- γ pós-vacinação, vista por marcação intracelular ($p=0,06$). O número reduzido de animais no nosso estudo pode ser responsável pela falta de significância estatística nestes dados, porém, o percentual de células TCD4⁺ e TCD8⁺ expressando IFN- γ em macacos cynomolgus vacinados com pVAX-hsp65 pode ser considerado robusto quando comparados a

dados na literatura correlacionando a expressão desta citocina em vacinas candidatas para o controle da TB. Estudo recente com a vacina candidata AERAS-402, em fase clínica, avaliou a expressão de IFN- γ , em indivíduos saudáveis, e a média do percentual de células TCD4 e TCD8 antígeno-específicas expressando esta citocina não passou de 0,1%, sendo considerado o percentual suficiente para uma boa resposta imune (Abel *et. al*, 2010).

O TNF- α tem um papel essencial para o controle da infecção aguda e crônica por *M. tuberculosis*. Dentre os efeitos do TNF- α na TB incluem, a ativação de macrófagos (Flynn *et al*, 1995), a indução da apoptose (Keane *et. al.*, 1997 e 2002), a produção de citocinas (Saunders *et. al.*, 1999; Algood *et. al.*, 2004) e a expressão de moléculas de adesão (Lopez Ramirez *et. al.*, 1994; Schreiber *et. al.*, 2006). Nossos dados demonstram que as células TCD4 e NK de animais vacinados com pVAX-hsp65 expressaram altos níveis de TNF- α quando comparados com os dados pré-vacinais, bem como a tendência de células TCD8 em aumentar a expressão desta citocina no 6º mês p.v ($p=0,06$). Esta observação se encaixa bem com a importância atribuída ao TNF- α na resistência à tuberculose (Flynn *et. al.*, 1995), e particularmente, no controle da infecção latente por *M. tuberculosis* (Keane *et. al*, 2001; Harris *et. al*, 2010).

A citocina IL-12 tem sido extensivamente estudada em infecções micobacterianas (Stobie *et al.*, 2000). Mais recentemente, a IL-12 tem feito parte de formulações de vacinas candidatas contra a TB e os resultados mostram que a adição de IL-12 aumenta a proteção das vacinas quando comparadas com a BCG (Ha *et. al.*, 2006; Li *et. al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2006). Este fato está relacionado com o desenvolvimento de células Th1 de memória quando a IL-12 está presente por um período prolongado. Em nosso estudo, os monócitos estimulados com os

peptídeos da proteína HSP65 tenderam ao aumento da expressão de IL-12, preferencialmente no 4º mês após a primeira dose vacinal, demonstrando a possibilidade da vacina em direcionar a resposta imune para o perfil Th1.

A IL-6 é produzida por monócitos, macrófagos, linfócitos e fibroblastos e estimula a produção de células B, a proliferação de células T, a ativação do mecanismo natural de morte celular e citotoxicidade. Alguns estudos têm demonstrado aumento da concentração de IL-6 no lavado broncoalveolar (BAL) de pacientes com infecção pulmonar (Schutte *et al.* 1996). Da mesma forma, Montón *et al.* (1996) encontraram altos níveis de IL-6 no soro e BAL de pacientes com pneumonia. Estes resultados sugerem que a ação da IL-6 não é somente local, mas também ocorre em um nível sistêmico, induzindo a síntese hepática de proteínas de fase aguda, que são observadas durante a inflamação pulmonar (Heinrich *et al.* 1990). Em nosso estudo, houve um aumento desta citocina em animais vacinados com pVAX-hsp65 no 4º mês p.v. A IL-6 modula negativamente as células Treg (Bettelli *et al.*, 2006) e juntamente com TGF- β , induz a diferenciação de células Th17 e auxiliam a manutenção de células T de memória (Pape *et al.*, 1997; Haynes *et al.*, 2004). Recentemente, a elevada produção de IL-6, TNF- α e IL-17 nos pulmões de camundongos induzida pela vacinação com a BCG, foi considerada importante moduladora do crescimento bacteriano e compensa a baixa produção de IFN- γ neste modelo experimental. Não quantificamos nos pulmões estas citocinas, mas os níveis séricos indicam uma produção compensatória com TNF- α e IL-6.

6-Conclusões

6- CONCLUSÕES

- A) A vacina pVAX-hsp65 administrada via eletroporação em primatas não humanos (macacos cynomolgus) não causou eventos adversos aparentes no local da aplicação;
- B) A eletroporação foi bem tolerada pelos animais, sem alterações no *status* fisiológicos, sem demonstração de sinais de dor e desconforto até 48h pós-vacinação;
- C) A vacinação dos macacos cynomolgus com a pVAX-hsp65 não alterou os parâmetros hematológicos não induzido anemia ou leucopenia;
- D) A vacina pVAX-hsp65 não induziu à conversão ao teste tuberculínico em macacos cynomolgus, evidenciando uma boa abordagem para futuros testes diagnósticos, sem interferência com a infecção natural;
- E) A vacina não causou toxicidade, tanto hepática quanto renal, demonstrando sua segurança na possível administração em fase clínica I em humanos;
- F) A vacinação induziu ao aumento de células TCD4⁺ e de TCD8⁺ de memória central o que caracteriza a ativação de células T e a formação de células de memória capazes de migrar para os linfonodos e, com isso, serem diferenciadas em células efectoras capazes de reconhecer a micobactéria;

- G) Células Dendríticas com perfil plasmacitóides foram identificadas após a vacinação e podem ser importantes para a apresentação antigênica e ativação de células T antígeno-específicas nos linfonodos e pulmões;
- H) A pVAX-hsp65 induziu ao aumento de IFN- γ em células NK e a tendência ao aumento da expressão desta citocina em células TCD4 e TCD8, evidenciando uma possível resposta Th1, efetiva para o controle micobacteriano;
- I) A pVAX-hsp65 induziu o aumento de TNF- α em células NK e linfócitos TCD4⁺, bem como a tendência ao aumento da expressão desta citocina em células TCD8⁺, evidenciando uma possível resposta Th1, efetiva para o controle micobacteriano;
- J) A vacinação induziu à proliferação de linfócitos B, pela presença do marcador Ki-67, indicando o potencial desta célula na apresentação de antígenos para a geração de células T de memória, corroborando com o aumento de células TCD4 de memória central neste estudo;
- K) A vacinação dos macacos cynomolgus com a pVAX-hsp65 induziu aumento de IL-6 periférico após estímulo com antígenos de HSP65 o que pode ser benéfico para a manutenção do granuloma e contenção das micobactérias.

7-Referências

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, Oct 31; 383(6603): 787-93, 1996.

Abel B, Tameris M, Mansoor N, *et al.* The novel tuberculosis vaccine, AERAS-402, induces robust and polyfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cells in adults. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010; 181(12), 1407–1417.

Algood HM, Lin PL, Yankura D, *et al.* TNF influences chemokine expression of macrophages *in vitro* and that of CD11b⁺ cells *in vivo* during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* 2004; 172(11):6846–57.

Almeida LP, Trombone AP, Lorenzi JC, Rocha CD, Malardo T, Fontoura IC, Gembre AF, Silva RL, Silva CL, Castelo AP, Coelho-Castelo AA. B cells Can Modulate the CD8 Memory T Cell after DNA Vaccination Against Experimental Tuberculosis. *Genet Vaccines Ther.* 2011 Mar 14;9:5.

Altare F, Durandy A, Lammas D, Emile JF, Lamhamedi S, Le Deist F, Drysdale P, Jouanguy E, Doffinger R, Bernaudin F, Jeppsson O, Gollob JA, Meinel E, Segal AW, Fischer A, Kumararatne D, Casanova JL. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science*, 280:1432–1435, 1998.

Andrade MC, Ribeiro CT, Silva VF, Molinaro EM, Gonçalves MA, Marques MA, Cabello PH, *et al.* Biologic Data of *Macaca mulatta*, *Macaca fascicularis*, and *Saimiri sciureus* Used for Research at the Fiocruz Primate Center. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99 (6):581–589.

Avgustin B, Kotnik V, Skoberne M, *et al.* CD69 expression on CD4⁺ T lymphocytes after *in vitro* stimulation with tuberculin is an indicator of immune sensitization against *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005, 12: 101–6.

Babiuk S, Mookherjee N, Pontarollo R, Griebel P, van Drunen Littel-van den Hurk S, Hecker R, Babiuk L. TLR9^{-/-} and TLR9^{+/+} mice display similar immune responses to a DNA vaccine. *Immunology.* 2004 Sep;113(1):114-20.

Bai X, Wilson SE, Chmura K, *et al.* Morphometric analysis of Th(1) and Th(2) cytokine expression in human pulmonary. *Tuberculosis.* 2004, 84:375–85.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998; 392 (6673):245-52.

Belkaid Y, Tarbell K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:551-89.

Betelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006 May 11;441(7090):235-8

Bomford R. Adjuvants for anti-parasites vaccines. *Parasitol.Today*, v.5, p.41-6, 1989.

Bonato VL, Lima VM, Tascon RE, *et al.* Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis* - infected mice. *Infect Immun* 1998;66:169–75.

Boom WH, Canaday DH, Fulton SA, *et al.* Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. *Tuberculosis*. 2003; 83:98–106.

Brandt L, Skeiky YA, Alderson MR, *et al.* The protective effect of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine is increased by coadministration with the *Mycobacterium tuberculosis* 72-kilodalton fusion polyprotein Mtb72F in *M. tuberculosis*-infected guinea pigs. *Infect. Immun.* 2004; 72(11), 6622–6632.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância epidemiológica de eventos adversos pós-vacinação / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2008.

Brookes RH, Hill PC, Owiafe PK, *et al.* Safety and immunogenicity of the candidate tuberculosis vaccine MVA85A in West Africa. *PLoS ONE* 2008; 3(8), e2921.

Browning CH, Gulbransen R. Studies on experimental tuberculosis in mice. I. The susceptibility of mice to inoculation with tubercle bacilli. *J Hyg.* 1926; 25:323–32.

Buchbinder SP, Mehrotra DV, Duerr A, *et al.* Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet.* 2008; 372(9653), 1881–1893.

Canetti G. The tubercle bacillus in the pulmonary lesion of man. *Rev Tuberc.* 1955 Dec;19(12):1392-5

Capuano SV, Croix DA, Pawar S, Zinovik A, Myers A, Lin PL, Bissel S, *et al.* Experimental *Mycobacterium tuberculosis* infection of cynomolgus macaques closely resembles the various manifestations of human *M. tuberculosis* infection. *Infect Immun.* 2003; 71(10):5831-44.

Caruso A, Licenziati S, Corulli M, Canaris AD, De Francesco MA, Fiorentini S, Peroni L, *et al.* Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry* 1997;27:71–76.

Caruso AM, Serbina N, Klein E, Triebold K, Bloom BR, Flynn JL. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. *J Immunol*, 1; 162(9): 5407-16, 1999.

CBER. Guidance for Industry: Considerations for Developmental Toxicity Studies for Preventive and Therapeutic Vaccines for Infectious Disease Indications. 2006. <http://www.fda.gov/cber/gdlns/reprotox.htm>

CBER. Guidance for Industry Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious disease Indications. Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research November 2007 http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/FDA/FDA_plasnavac.pdf

Chang, PY.; Roelands, J.; Schindler-Horvat, J.; Sheets, RL. Chapter 14. Toxicity Testing of Vaccines. In: Sietsema, W.; Schwen, R., editors. Nonclinical Drug Safety Assessment: Practical Considerations for Successful Registration. Washington, DC: FDAnews; 2007. p. 331-343.

Chen CY, Huang D, Wang RC, Shen L, Zeng G, et al. (2009) A Critical Role for CD8 T Cells in a Nonhuman Primate Model of Tuberculosis. PLoS

Cole ST, Brosch R, Parkhill J. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature 1998; 393: 537–544.

Cooper AM, Dalton DK, Stewart JP, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon-gamma gene disrupted mice. J Exp Med. 1993; 178:2243.

Cooper AM. T cells in mycobacterial infection and disease. Curr Opin Immunol. 2009 Aug;21(4):378-84. Epub 2009 Jul 29.

Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. Trends Immunol. 2001; 22(11):633-40.

Dannenber AM Jr. (1998) Lurie's tubercle-count method to test TB vaccine efficiency in rabbits. Frontiers in Bioscience 3: c27-33. Available on the Internet: <http://www.bioscience.org/1998/v3/c/dannenbe/list.htm>

De la Barrera S, Aleman M, Musella R, Schierloh P, Pasquinelli V, Garcia V, Abbate E, Sasiain MD. IL-10 down-regulates costimulatory molecules on Mycobacterium tuberculosis-pulsed macrophages and impairs the lytic activity of CD4 and CD8 CTL in tuberculosis patients. Clin Exp Immunol 138:128-138, 2004.

De Libero G, Flesch I, Kaufmann SHE. Mycobacteria-reactive Lyt-2+ T cell lines. Eur J Immunol 18:59–66, 1988.

Delogu G, Fadda G. The quest for a new vaccine against tuberculosis. J Infect Developing Countries 2009; 3(1):5-15.

Denis O, Tanghe A, Palfliet K, et al. Vaccination with plasmid DNA encoding mycobacterial antigen 85A stimulates a CD4+ and CD8+ T-cell epitopic repertoire broader than that stimulated by *M. tuberculosis* H37Rv infection. Infect.Immun. 1998; 66, 1527-1533.

Derrick SC, Repique C, Snoy P, et al. Immunization with a DNA vaccine cocktail protects mice lacking CD4 cells against an aerogenic infection with *M. tuberculosis*. Infect.Immun. 2004; 72, 1685-1692.

Dheda K, Schwander SK, Zhu B, van Zyl-Smit RN, Zhang Y. The immunology of tuberculosis: from bench to bedside. Respirology. 2010 Apr;15(3):433-50.

Dose-Escalation Study on Safety and Immunogenicity of VPM1002 in Comparison With BCG in Healthy Male Volunteers <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00749034>

Dose-Escalation Study on Safety and Immunogenicity of VPM1002 in Comparison to BCG in Healthy Volunteers in South Africa <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01113281>

Dye C, Scheele S, Dolin P, *et al.* Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. JAMA 1999; 282: 677–686.

Ehlers S. Role of tumour necrosis factor (TNF) in host defence against tuberculosis: implications for immunotherapies targeting TNF. Ann Rheum Dis, 62 Suppl 2:ii37-42, 2003.

Elias D, Britton S, Aseffa A *et al.* Poor immunogenicity of BCG in helminth infected population is associated with increased in vitro TGF-eta production. Vaccine 2008; 26: 3897–902.

Fenton MJ, Vermeulen MW, Kim S, Burdick M, Strieter RM, Kornfeld H. Induction of interferon production in human alveolar macrophages by *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 65:5149–5156, 1997.

Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. J Exp Med 178:2249-2254, 1993.

Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. Annu Rev Immunol.; 19:93-129, 2001.

Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, *et al.* 1995. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. Immunity. 1995, 2:561–72.

Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, Schreiber R, Mak TW, Bloom BR. Tumor necrosis factor-a is required in the protective immune response against *M. tuberculosis* in mice. Immunity 2:561–572,1995.

Frappier A, Portelance V, St-Pierre J, Panisset M. BCG strains: Status of characteristics and relative efficacy, immunization in tuberculosis in 1971. Washington, DC: US Department of Health, Education, and Welfare. 1971; 157-78.

Fuller CL, Flynn JL, Reinhart A. *In situ* study of abundant expression of proinflammatory chemokines and cytokines in pulmonary granulomas that develop in cynomolgus macaques experimentally infected with *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun. 2003; 71(12):7023-34.

Gauduin MC, Kaur A, Ahmad S, *et al.* Optimization of intracellular cytokine staining for the quantitation of antigen-specific CD4+ T cell responses in rhesus macaques. J Immunol Methods. 2004; 288:61-79

Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. Am J Pathol. 1991 Apr;138(4):867-73.

Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. Semin Cancer Biol. 1990 Jun;1(3):199-206. Review.

Glickman MS, Jacobs WR Jr. Microbial pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis: dawn of a discipline. Cell. 2001 Feb 23;104(4):477-85..

Grode L, Kursar M, Fensterle J, et al. Cell-mediated immunity induced by recombinant *M. bovis* Bacille Calmette-Guerin strains against an intracellular bacterial pathogen: importance of antigen secretion or membrane-targeted antigen display as lipoprotein for vaccine efficacy. J.Immunol. 2002; 168, 1869-1876.

Grode L, Seiler P, Baumann S, et al. Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *M. bovis* bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin. J.Clin.Invest 2005; 115; 2472-2479.

Gronevik E, Tollefsen S, Sikkeland LI, Haug T, Tjelle TE, Mathiesen I. DNA transfection of mononuclear cells in muscle tissue. J Gene Med 2003;10:909–17.

Gupta UD, Katoch VM. Animal models of tuberculosis. Tuberculosis. 2005; 85:277-293.

Gupta UD, Katoch VM. Animal models of tuberculosis. Tuberculosis: 85:277-293, 2005.

Ha S, Park S, Kim H, et al. Enhanced immunogenicity and protective efficacy with the use of interleukin-12-encapsulated microspheres plus AS01B in tuberculosis subunit vaccination. Infect Immun 2006; 74:4954–59.

Harding CV, Boom WH. Regulation of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis: a role for Toll-like receptors. Nat Rev Microbiol. 2010 Apr;8(4):296-307.

Harris, J., and J. Keane. How tumour necrosis factor blockers interfere with tuberculosis immunity. Clin. Exp. Immunol. 2010, 161:1–9.

Hayashi D, Takii T, Fujiwara N, et al. Enhancement of innate immunity against Mycobacterium infection by immunostimulatory DNA is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. Infect Immun. 2001, 69:6156–64.

Haynes L, Eaton SM, Burns EM, Rincon M, Swain SL. Inflammatory cytokines overcome age-related defects in CD4 T cell responses in vivo. J Immunol. 2004 May 1;172(9):5194-9.

Hess J, Miko D, Catic A, et al. *M. bovis* Bacille Calmette-Guerin strains secreting listeriolysin of Listeria monocytogenes. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1998; 95; 5299-5304.

Hesseling AC, Marais BJ, Gie RP et al. The risk of disseminated Bacille Calmette-Guérin (BCG) disease in HIV-infected children. Vaccine 2007; 25(1), 14–18.

Hickman SP, Chan J, Salgame P. Mycobacterium tuberculosis induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naive T cell polarization. J Immunol. 2002; 1;168(9):4636-42.

Hoft DF, Blazevic A, Abate G *et al.* A new recombinant Bacille Calmette–Guérin vaccine safely induces significantly enhanced tuberculosis-specific immunity in human volunteers. *J. Infect. Dis.* 2008; 198(10), 1491–1501.

Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Maslesa-Galic S. Enhancing the protective efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against tuberculosis by boosting with the *Mycobacterium tuberculosis* major secretory protein. *Infect Immun.* 2005 Aug;73(8):4676-83.

Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ. *et al.* Recombinant bacillus calmette-guerin (BCG) vaccines expressing the *M. tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000; 97;13853-13858.

Horwitz MA, Harth, G. A new vaccine against tuberculosis affords greater survival after challenge than the current vaccine in the guinea pig mode of pulmonary tuberculosis. *Infect.Immun* 2003; 71;1672-1679.

Hosmalin A, Lichtner M, Louis S. Clinical analysis of dendritic cell subsets: the dendritogram. *Methods Mol Biol.* 2008;415:273-90.

Howard AD, Zwillig BS. Cytokine production by CD4 and CD8 T cells during the growth of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Clin Exp Immunol* 113:443–449, 1998.

Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 20:197-216, 2002.

Jang S, Uematsu S, Akira S, Salgame P. IL-6 and IL-10 induction from dendritic cells in response to *Mycobacterium tuberculosis* is predominantly dependent on TLR2-mediated recognition. *J Immunol.* Sep 1;173 (5):3392-7, 2004.

Janković V, Messaoudi I, Nikolich-Zugich J. Phenotypic and functional T-cell aging in rhesus macaques (*Macaca mulatta*): differential behavior of CD4 and CD8 subsets. *Blood.* 2003;102(9):3244-51.

Jego G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity.* 2003 Aug;19(2):225-34.

Kamath AT, Rochat AF, Christensen D, *et al.* A liposome-based mycobacterial vaccine induces potent adult and neonatal multifunctional T cells through the exquisite targeting of dendritic cells. *PLoS ONE* 2009; 4(6), e5771.

Kamath AT, Rochat AF, Valenti MP, *et al.* Adult-like anti-mycobacterial T cell and *in vivo* dendritic cell responses following neonatal immunization with Ag85B-ESAT-6 in the IC31 adjuvant. *PLoS ONE* 2008; 3(11), e3683.

Kaufmann SH, Vöth U, Thole JE, *et al.* Enumeration of T cells reactive with *Mycobacterium tuberculosis* organisms and specific for the recombinant mycobacterial 64-kDa protein. *Eur J Immunol.* 1987; 17:(3):351-7.

- Kaufmann SH. Fact and fiction in tuberculosis vaccine research: 10 years later. *Lancet Infect Dis.* 2011 Aug;11(8):633-40.
- Kaufmann SHE. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 20–30.
- Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG, et al. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun.* 1997; 65:298–304.
- Keane J, Gershon S, Wise RP, et al. 2001. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N. Engl. J. Med.* 2001, 5:1098–104.
- Keane J, Shurtleff B, Kornfeld H. TNF-dependent BALB/c murine macrophage apoptosis following *Mycobacterium tuberculosis* infection inhibits bacillary growth in an IFN-gamma independent manner. *Tuberculosis.* 2002; 82:55–61.
- Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, Ohara N, Kaneda Y, Kuwayama S, Muraki Y, et al. Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine.* 2005; 23:2132–2135.
- Lambert PH, Hawkridge T, Hanekom WA New vaccines against tuberculosis. *Clin Chest Med.* 2009 Dec;30(4):811-26.
- Lande R, Giacomini E, Grassi T, Remoli ME, Iona E, Miettinen M, Julkunen I, Coccia EM. IFN-alpha beta released by *Mycobacterium tuberculosis*-infected human dendritic cells induces the expression of CXCL10: selective recruitment of NK and activated T cells. *J Immunol.* 2003 Feb 1;170(3):1174-82.
- Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol.* 2000 Oct;1(4):311-6.
- Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* 1:311–316, 2000.
- Langermans JA, Doherty TM, Vervenne RA, et al. Protection of macaques against *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. *Vaccine* 2005; 23:2740–50.
- Lasaro MO, Ertl HC. New insights on adenovirus as vaccine vectors. *Mol. Ther.* 2009; 17(8), 1333–1339.
- Lewinsohn DM, Alderson MR, Briden AL, Riddell SR, Reed SG, Grabstein KH. Characterization of human CD8+ T cells reactive with *Mycobacterium tuberculosis*-infected antigen presenting cells. *J Exp Med;* 187:1633–1640, 1998.
- Li H, Li R, Zhong S, et al. The immunogenicity and protective efficacy of Mtb8.4/hIL-12 chimeric gene vaccine. *Vaccine.* 2006; 24:1315–23.

Li Z, Howard A, Kelley C, *et al.* Immunogenicity of DNA vaccines expressing tuberculosis proteins fused to tissue plasminogen activator signal sequences. *Infect.Immun.* 1999; 67, 4780-4786.

Lima KM, Santos AS, Lima VMF, *et al.* Single-dose of a vaccine based on DNA encoding mycobacterium hsp65 protein plus TDM- loaded microspheres protects mice against a virulent strain of Mycobacterium tuberculosis. *Gene* 2003; 10: 678-85.

Lima VMF. Role of trehalose Dimycolate in recruitment of cells and modulation of production of cytokines and NO in tuberculosis. *Infect Immun.* 2001; 69:5305-12.

Liu YJ, Kadowaki N, Rissoan MC, Soumelis V. T cell activation and polarization by DC1 and DC2. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2000; 251:149-59.

López Ramírez GM, Rom WN, Ciotoli C, *et al.* Mycobacterium tuberculosis alters expression of adhesion molecules on monocytic cells. *Infect Immun.* 1994; 62:2515–20.

Lowrie DB, Colston MJ, Tascon RE, Silva CL. DNA encoding individual mycobacterial antigens protects mice against tuberculosis. In: Brown F, Burton D, Doherty P, Mekalanos J, Norrby E (eds). *Molecular Approaches to the control of infectious Diseases.* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 97:163-166, 1997 a.

Lowrie DB, Silva CL, Colston MJ, Ragno S, Tascon RE. Protection against tuberculosis by plasmid DNA. *Vaccine* 15:834-838, 1997 d.

Lowrie DB, Silva CL, Tascon RE. DNA vaccines against tuberculosis. *Immunol Cell Biol* 75:591-594, 1997 b.

Lowrie DB, Silva CL, Tascon RE. Genetic vaccination against tuberculosis. *Springer Semin Immunopathol* 19:161-173, 1997 c.

Lowrie DB, Silva CL, Tascon RE. Progress towards a new tuberculosis vaccine. *Bio Drugs* 10:201-213, 1998.

Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VLD, *et al.* Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature.* 1999; 400: 269-71.

Lowrie DB, Tascon RE, Silva CL. Vaccination against tuberculosis. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 108:309-12

Luckay, A.; Sidhu, M.; Kjekken, R.; Megati, S.; Chong, S.Y.; Roopchand, V.; Garcia-Hand, D.; Abdullah, R.; Braun, R.; Montefiori, D.C.; Rosati, M.; Felber, B.K.; Pavlakis, J.N.; Mathiesen, I.; Israel, Z.R.; Eldridge, J.H.; Egan, M.H. Effect of Plasmid DNA Vaccine Design and In Vivo Electroporation on the Resulting Vaccine-Specific Immune Responses in Rhesus Macaques. *Journal of Virology*, May 2007, p. 5257–5269.

Lurie MB, Dannenberg Jr AM. Macrophage function in infectious disease with inbred rabbits. *Bacteriol Rev.*1965; 29:466–76.

Lurie MB. The correlation the biological changes and the fate of living tubercle bacilli in the organs of tuberculous rabbits. *J Exp Med.* 1932; 55:31–54.

Mackanness GB. The immunology of antituberculous immunity. *Am Rev Respir Dis* 1968; 97:337–44.

Mansoor N, Scriba TJ, de Kock M *et al.* HIV-1 infection in infants severely impairs the immune response induced by Bacille Calmette-uerin vaccine. *J. Infect. Dis.* 2009; 199 982–90.

Mathiesen I. Electroporabilization of skeletal muscle enhances gene transfer in vivo. *Gene Ther* 1999;6:508–14.

McKee CM, Rake G, *et al.* The use of the mouse in a standardized test for antituberculous activity of compounds of natural or synthetic origin; choice and standardization of culture. *Am Rev Tuberc.* 1949 Jul;60(1):90-108

McMurray DM. Guinea pig model of tuberculosis, 113-134. In Bloom BR (ed), *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control.* ASM Press, Washington, DC 1994.

McMurray DN. A non human primate model for pré-clinical testing of new tuberculosis vaccine. *Cli Infect Dis*; 30:s210-0, 2000.

McMurray DN. Disease model: pulmonary tuberculosis *Trends. Mol Med.* Mar; 7(3): 135-7, 2001.

Mcshane H, Brookes R, Gilbert SC, *et al.* Enhanced immunogenicity of CD4(–) T-cell responses and protective efficacy of a DNA-modified vaccinia virus Ankara prime–boost vaccination regimen for murine tuberculosis. *Infect. Immun.* 2001; 69(2), 681–686.

Mihret A, Mamo G, Tafesse M, Hailu A, Parida S. Dendritic Cells Activate and Mature after Infection with *Mycobacterium tuberculosis.* *BMC Res Notes.* 2011 Jul 21;4:247.

Miki-Hosokawa T, Hasegawa A, Iwamura C, *et al.* CD69 controls the pathogenesis of allergic airway inflammation. *J Immunol.* 2009, 183:8203–15.

Mora JR, von Andrian UH. T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. *Trends Immunol.* 2006 May;27(5):235-43. Epub 2006 Mar 31.

Moradi G, Naieni KH, Rashidian A, *et al.* Evaluation of Tuberculosis Situation in Economic Cooperation Countries in 2009; Achievement and Gaps toward Millennium Development Goals. *Int J Prev Med.* 2012; 3(2):77-83.

Murray RA, Mansoor N, Harbacheuski R, *et al.* *Bacillus Calmette Guerin* vaccination of human newborns induces a specific, functional CD8+ T cell response. *J Immunol.* 2006, 177: 5647–51.

Mustafa AS, Lundin KE, Meloen RH, *et al.* Identification of promiscuous epitopes from the *Mycobacterium tuberculosis* 65-kilodalton heat shock protein recognized by human CD4(+) T cells of the *Mycobacterium leprae* memory repertoire. *Infect Immun.* 1999; 67:5683-9.

- Nathan CF, Prendergast TJ, Wiebe ME, et al. Activation of human macrophages. Comparison of other cytokines with interferon-gamma. *J ExpMed*. 1984, 160:600–5.
- Neumann M, Fries H, Scheicher C, Keikavoussi P, Kolb-Mäurer A, Bröcker E, Serfling E, Kämpgen E. Differential expression of Rel/NF-kappaB and octamer factors is a hallmark of the generation and maturation of dendritic cells. *Blood*. 2000 Jan 1;95(1):277-85.
- Oddo M, Renno T, Attinger A, Bakker T, MacDonald HR, Meylan PR. Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 160:5448–5454, 1998.
- O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis*. 1995; 76 Suppl 1:1-46.
- Organização Mundial de Saúde. Global Tuberculosis Programme and Global Programme on Vaccines. Statement on BCG revaccination for the prevention of tuberculosis. *Weekly Epidemiological Record*. 1995; 70: 229-236.
- Organização Mundial de Saúde. Strategic Framework to decrease the burden of TB/HIV, 2002; (WHO/CDS/TB 2002.296).
- Orme IM, Andersen P, Boom WH. The role of CD8+T cells in immunity to tuberculosis infection. *Trends Microbiol*. 1993; 1:77–8.
- Orme IM. The Achilles heel of BCG. *Tuberculosis*. 2010, 90: 329–32.
- Otten TF, Mokrousov IV, Narvskaia OV, Vishnevskii BI. [Bacteriological diagnosis of mycobacteriosis: possibilities and prospects]. *Probl Tuberk Bolezn Legk*. 2004;(5):32-5.
- Pal PG, Horwitz MA. Immunization with extracellular proteins of *M. tuberculosis* induces cell-mediated immune responses and substantial protective immunity in a guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Infect.Immun*. 1992; 60;4781-4792.
- Palmer CE, Shaw LW, Comstock GW. Community trials of BCG vaccination. *American Review of Tuberculosis and Pulmonary Diseases*; 77(6): 877-907, 1958.
- Pape KA, Khoruts A, Mondino A, Jenkins MK. Inflammatory cytokines enhance the in vivo clonal expansion and differentiation of antigen-activated CD4+ T cells. *J Immunol*. 1997 Jul 15;159(2):591-8
- Pawlowski A, Jansson M, Skořid M, et al. Tuberculosis and HIV Co-Infection. *PLoS Pathog* 2012; 8(2): 1002464. doi:10.1371/journal.ppat.1002464.
- Peters W, Ernst JD. Mechanisms of cell recruitment in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect*. 2003 Feb;5(2):151-8
- Prabha C, Kripa VJ, Ram Prasad M, Sulochana D. Role of TNF- α in host immune response in tuberculous pleuritis. *Curr Sci* 85 : 639-52, 2003.
- Prud'homme GJ, Draghia-Akli R, Wang Q. Plasmid-based gene therapy of diabetes mellitus. *Gene Ther* 2007;14(7):553—64.

Purdy GE. Taking Out TB-Lysosomal Trafficking and Mycobactericidal Ubiquitin-Derived Peptides. *Front Microbiol.* 2011; 2:7.

Radosevic K, Wieland CW, Rodriguez A, *et al.* Protective immune responses to a recombinant adenovirus type 35 tuberculosis vaccine in two mouse strains: CD4 and CD8 T-cell epitope mapping and role of γ interferon. *Infect. Immun.* 2007; 75(8), 4105–4115.

Raleigh GW, Youmans GP. The use of mice in experimental chemotherapy of tuberculosis. *J Infect Dis.* 1949; 82:197–204.

Reed SG, Coler RN, Dalemans W, *et al.* Defined tuberculosis vaccine, Mtb72F/AS02A, evidence of protection in cynomolgus monkeys. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2009; 106(7), 2301–2306.

Rhoades ER, Frank AA, Orme IM. Progression of chronic pulmonary tuberculosis in mice aerogenically infected with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber. Lung Dis.* 1997; 78:57-66.

Rodrigues LC, Diwan VK, Wheeler JG. Protective effect of BCG against tuberculous meningitis and miliary tuberculosis: a meta-analysis. *Int J Epidemiol.* 1993; 22: 1154-1158.

Rodrigues LC, Pereira SM, Cunha SS *et al.* Effect of BCG revaccination on incidence of tuberculosis in school-aged children in Brazil: the BCG-REVAC cluster-randomised trial. *Lancet* 2005; 366(9493), 1290–1295.

Rook GA. Th2 cytokine in susceptibility to tuberculosis. *Curr Mol Med.* 2007, 7: 327–37.

Rosada RS, de la Torre LG, Frantz FG, *et al.* Protection against tuberculosis by a single intranasal administration of DNA-hsp65 vaccine complexed with cationic liposomes. *BMC Immunol* 2008; 9:38-50.

Rosati, M.; Valentina, A.; Jalah, R.; Patel, V.; Gegerfelt, A.; Bergamaschia, C.; Alicea, C.; Weiss, D.; Treecec, J.; Pal, R.; Markhamc, P.; Marquesd, E.T.A.; August, T.; Khane, A.; Draghia-Aklie, R.; Felberb, B.K.; Pavlakis, G.N. Increased immune responses in rhesus macaques by DNA vaccination combine with electroporation *Vaccine* 26 (2008) 5223–5229.

Roth AE, Benn CS, Ravn H *et al.* Effect of revaccination with BCG in early childhood on mortality: randomised trial in Guinea-Bissau. *BMJ* 2010; 340, c671.

Rowland R, McShane H. Tuberculosis vaccines in clinical trials *Expert Rev. Vaccines* 2011; 10(5), 645–658.

Ruberti M, Lima KM, Dos Santos SA, *et al.* Prime-boost vaccination based on DNA and protein-loaded microspheres for tuberculosis prevention. *J Drug Target* 2004; 12:195-203.

Sachsenberg N, Perelson AS, Yerly S, Schockmel GA, Leduc D, Hirschel B, Perrin L. Turnover of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in HIV-1 infection as measured by Ki-67 antigen.

Safety and Immunogenicity of AERAS-402 in HIV-infected, bacillus Calmette–Guérin (BCG)-Vaccinated Adults <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01017536>

Sander CR, Pathan AA, Beveridge NE, *et al.* Safety and immunogenicity of a new tuberculosis vaccine, MVA85A, in *Mycobacterium tuberculosis*-infected individuals. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2009; 179(8), 724–733.

Sardesai NY, Weiner DB. Electroporation delivery of DNA vaccines: prospects for success. *Curr. Opin. Immunol* 2011; 23(3), 421–429.

Saunders BM, Dane A, Briscoe H, Britton WJ. Characterization of immune responses during infection with *Mycobacterium avium* strains 100, 101 and the recently sequenced 104. *Immunol Cell Biol.* 2002 Dec;80(6):544-9.

Saunders BM, Frank AA, Orme IM. Granuloma formation is required to contain bacillus growth and delay mortality in mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology.* 1999; 98:324–8.

Schlesinger LS. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol.* 1993 Apr 1;150(7):2920-30.

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000 Mar;182(3):311-22. *J Exp Med.* 1998 Apr 20;187(8):1295-303.

Schreiber T, Ehlers S, Aly S, *et al.* Selectin ligand-independent priming and maintenance of T cell immunity during airborne tuberculosis. *J Immunol.* 2006; 176:1131–40.

Schuurman HJ, Smith HT. Reference values for clinical chemistry and clinical hematology parameters in cynomolgus monkeys. *Xenotransplantation.* 2005; 12: 72–75.

Scriba TJ, Tameris M, Mansoor N, *et al.* Modified vaccinia Ankara-expressing Ag85A, a novel tuberculosis vaccine, is safe in adolescents and children, and induces polyfunctional CD4⁺T cells. *Eur. J. Immunol.* 2010; 40(1), 279–290.

Serbina NV, Flynn JL. CD8(+) T cells participate in the memory immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 2001 Jul;69(7):4320.

Serbina NV, Lazarevic V, Flynn JL. CD4(+) T cells are required for the development of cytotoxic CD8(+) T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* 2001 Dec 15;167(12):6991-7000.

Silva CL, Bonato VLD, Coelho-Castelo AAM, De Souza AO, Santos AS, Lima KM, Faccioli LH, Rodrigues JM. Immunotherapy with plasmid DNA encoding mycobacterial hsp65 in association with chemotherapy is a more rapid and efficient form of treatment for tuberculosis in mice. *Gene Therapy,* 12, 281-287, 2005.

Silva CL, Bonato VLD, Lima VMF, Faccioli LH, Leão SC. Characterization of the memory/activated T-cells that mediate the long-lived host response against

tuberculosis after bacillus Calmette-Guerin or DNA vaccination. *Immunology* 97: 573-581, 1999.

Silva CL, Lowrie DB. A single mycobacterial protein (hsp 65) expressed by a transgenic antigen-presenting cell vaccinates mice against tuberculosis. *Immunology*. Jun; 82(2):244-8, 1994.

Silva CL, Lukacs K, Lowrie DB. Major histocompatibility complex non-restricted presentation to CD4+ T-lymphocytes of *Mycobacterium leprae* heat-shock protein 65 antigen by macrophages transfected with the mycobacterial gene. *Immunology*; 78: 35-42, 1993.

Silva CL, Lukacs K, Lowrie DB. Major histocompatibility complex non-restricted presentation to CD4+ T-lymphocytes of *Mycobacterium leprae* heat-shock protein 65 antigen by macrophages transfected with the mycobacterial gene. *Immunology*; 78: 35-42, 1993.

Silva CL, Palacios A, Colston MJ, Lowrie DB. *Mycobacterium leprae* 65hsp antigen expressed from a retroviral vector in a macrophage cell line is presented to T cells in association with MHC class II in addition to MHC class I. *Microb Pathog* 12:27-38, 1992.

Silva CL, Silva MF, Pietro RC, *et al.* Protection against tuberculosis by passive transfer with T-cell clones recognizing mycobacterial heat-shock protein 65. *Immunology* 1994; 83:341-6.

Silva CL, Silva MF, Pietro RC, Lowrie DB. Characterization of T cells that confer a high degree of protective immunity against tuberculosis in mice after vaccination with tumor cells expressing mycobacterial hsp65. *Infect Immun*. Jul; 64(7): 2400-7, 1996.

Silva CL, Silva MF, Pietro RCLR, Lowrie DB. Protection against tuberculosis by passive transfer with T cell clones recognizing mycobacterial heat-shock protein 65. *Immunology* 83:341-346, 1994.

Silva CL, Lowrie DB. A single mycobacterial protein (hsp 65) expressed by a transgenic antigen-presenting cell vaccinates mice against tuberculosis. *Immunology*. 1994; 82(2):244-8.

Silva CL. The potential use of heat-shock proteins to vaccinate against mycobacterial infections. *Microbes Infect*. 1999; 1(6):429-35.

Simon, A.J.; Casimiro, D.R.; Finnefrock, A.C.; Davies, M.E.; Tang, A.; Chenb, M.; Chastainb, M.; Kath, G.S.; Chen, L.; Shiver, J.W. Enhanced in vivo transgene expression and immunogenicity from plasmid vectors following electrostimulation in rodents and primates Shiver. *Vaccine* 26 (2008) 5202–5209.

Skeiky YA, Alderson MR, Owendale PJ, *et al.* Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. *J. Immunol*. 2004; 172(12), 7618–7628.

Souza PR, Zárate-Bladés CR, Hori JI, *et al.* Protective efficacy of different strategies employing *Mycobacterium leprae* heat-shock protein 65 against tuberculosis. *Expert Opin Biol Ther* 2008; 8:1255-64.

Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, Ganz T, Thoma-Uszynski S, Mellian A, Bogdan C, Porcelli SA, Bloom BR, Krensky AM, Modlin RL. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*, 2; 282(5386):121-5, 1998.

Stobie L, Gurunathan S, Prussin C, *et al.* The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:8427–32.

Stubbe M, Vanderheyde N, Goldman M, Marchant A . Antigen-specific central memory CD4+ T lymphocytes produce multiple cytokines and proliferate in vivo in humans. *J Immunol*. 2006 Dec 1;177(11):8185-90.

Sun R, Skeiky YA, Izzo A *et al.* Novel recombinant BCG expressing perfringolysin O and the over-expression of key immunodominant antigens; pre-clinical characterization, safety and protection against challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* 2009; 27(33), 4412–4423.

Tan JS, Canaday DH, Bloom WH, Balaji KN, Schwander SK, Rick EA. Human alveolar T lymphocyte responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigen: role for CD4+ and CD8+ cytotoxic T cells and relative resistance of alveolar macrophages to lysis. *J Immunol* 159:290–297, 1997.

Tascon RE, Colston MJ, Ragno S, *et al.* Vaccination against tuberculosis by DNA injection. *Nat.Med*. 1996; 2, 888-892.

Ten Dam, HG. Research on BCG vaccination. *Adv Tuberc Res*. 1984; 21:79-106.

The Aeras Portfolio www.aeras.org/portfolio

Tristao-Sa R, Ribeiro-Rodrigues R, Johnson LT *et al.* Intestinal nematodes and pulmonary tuberculosis. *Rev. Soc. Bras. Med.Trop*. 2002; 35:533–5.

Turner J, D'Souza CD, Pearl JE, *et al.* CD8- and CD95/95L-dependent mechanisms of resistance in mice with chronic pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001, 24:203–9.

Ulmer JB, Wahren B, Liu MA. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. *Trends Mol.Med*. 2006; 12, 216-222.

Urdahl KB, Liggitt D, Bevan MJ. CD8+ T cells accumulate in the lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected Kb-/-Db-/- mice, but provide minimal protection. *J Immunol*. 2003, 170: 1987–94.

Van Dissel JT, Arend SM, Prins C, *et al.* Ag85B–ESAT-6 adjuvanted with IC31 promotes strong and long-lived *Mycobacterium tuberculosis* specific T cell responses in naive human volunteers. *Vaccine* 2010; 28(20), 3571–3581.

van Drunen, Littel-van den Hurk S, Hannaman D. Electroporation for DNA immunization: clinical application. *Expert Rev. Vaccines* 2010; 9:5, 503–517.

van Pinxteren LA, Cassidy JP, Smedegaard BH, et al. Control of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection is dependent on CD8 T cells. *Eur J Immunol.* 2000, 30:3689–98.

Verreck FA, Vervenne RA, Kondova I, et al. MVA85A boosting of BCG and an attenuated, *phoP* deficient *M tuberculosis* vaccine both show protective efficacy against tuberculosis in rhesus macaques. *PLoS One* 2009;4(4):e5264.

Von Eschen K, Morrison R, Braun M, et al. The candidate tuberculosis vaccine Mtb72F/AS02A: tolerability and immunogenicity in humans. *Hum. Vaccin.* 2009; 5(7), 475–482.

Walsh GP, Tan EV, dela Cruz EC, et al. The Philippine cynomolgus monkey provides a new nonhuman primate model of tuberculosis that resembles human disease. *Nat Med.* 1996; 2:430-6.

Wang J, Thorson L, Stokes RW, et al. Single mucosal, but not parenteral, immunization with recombinant adenoviral-based vaccine provides potent protection from pulmonary tuberculosis. *J. Immunol.* 2004; 173(10), 6357–6365.

Weinrich Olsen A, Van Pinxteren LA, Meng Okkels L, et al. Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85b and ESAT-6. *Infect. Immun.* 2001; 69(5), 2773–2778.

WHO. BCG vaccine. WHO position paper. *Wkly Epidemiol.* 2004; Rec. 79(4), 27–38.

Widera G, Austin M, Rabussay D, Goldbeck C, Barnett SW, Chen M, et al. Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation in vivo. *J Immunol* 2000;164:4635–40.

Wilson NS, El-Sukkari D, Belz GT, Smith CM, Steptoe RJ, Heath WR, Shortman K, Villadangos JA. Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood.* 2003 Sep 15;102(6):2187-94.

Winau F, Weber S, Sad S, Diego J, Hoops SL, Breiden B, Sandhoff K, Brinkmann, Kaufmann SHE, Schaible UE. Apoptotic Vesicles Crossprime CD8 T Cells and Protect against Tuberculosis. *Immunity*, 24, 105-117, 2006.

Woodworth JS, Behar SM (2006) *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8+ T cells and their role in immunity. *Crit Rev Immunol* 26: 317–352.

World Health Organization, *Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World: Fourth Global Report* (World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2008).

World Health Organization. *Global tuberculosis control 2010* [Internet]. Geneva: WHO; 2010 [cited 2011 Mar 7]. Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2010/en/index.html

Xing Z, McFarland CT, Sallenave JM, *et al.* Intranasal mucosal boosting with an adenovirus-vectored vaccine markedly enhances the protection of BCG-primed guinea pigs against pulmonary tuberculosis. PLoS ONE. 2009; 4(6), e5856.

Yoshida S, Tanaka T, Kita Y, *et al.* DNA vaccine using hemagglutinating virus of Japan-liposome encapsulating combination encoding mycobacterial heat shock protein 65 and interleukin-12 confers protection against Mycobacterium tuberculosis by T cell activation. Vaccine. 2006; 24:1191–1204.

Zhou LJ, Tedder TF. CD14(+) blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83(+) dendritic cells. Proc Natl Acad Sci USA 93:2588–2592, 1996.

Zugel U, Kaufmann SHE. Role of heat shock proteins in protection from pathogenesis of infectious diseases. Cil. Microbiol. Rev.,v.12,n.1,p.19-39, 1999.