

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



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

DYEGO DE SOUZA CARLÉTTI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROTETOR DA
VACINA GÊNICA pVAX_{apa}-DMT-Me NO MODELO
EXPERIMENTAL DE TUBERCULOSE**

Rio de Janeiro

2011

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROTETOR DA
VACINA GÊNICA pVAX_{apa}-DMT-Me NO MODELO
EXPERIMENTAL DE TUBERCULOSE**

DYEGO DE SOUZA CARLÉTTI

Dissertação apresentada ao
Curso de Pesquisa Clínica em
Doenças Infecciosas do Instituto
de Pesquisa Clínica Evandro
Chagas para obtenção do grau de
Mestre em Ciências.

Orientador: Dra. Cynthia Horn

Rio de Janeiro

2011

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

C285

Carlétti, Dyego de Souza

Avaliação do potencial protetor da vacina gênica pV AXapa-DMT-Me no modelo experimental de tuberculose / Dyego de Souza Carlétti. – Rio de Janeiro, 2011.
xii, 82 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2011.

Bibliografia: f. 58-79

1. Tuberculose. 2. Vacinas de DNA. 3. Imunização heteróloga. 4. Microesferas. 5. APA. I. Título.

CDD 616.995

A Deus, à minha mãe, à minha esposa Lívia,
à minha família, aos meus amigos-irmãos de
coração e à minha orientadora que me
auxiliou na construção desse trabalho.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus – Pai, Filho e Espírito Santo - que sempre está comigo onde quer que eu esteja. Por ter me dado forças para superar mais essa etapa de minha vida.

Agradeço a minha mãezinha Rose que está sempre me abraçando, mesmo não estando aqui neste momento, e me ouvindo nos momentos de choro, de alegria, de saudade, de solidão.

Agradeço ao meu pai Marcos por sempre ser esse homem de caráter que, mesmo na ausência de minha mãe, soube cuidar de mim e do meu irmão com muito amor, carinho e fé.

Agradeço a minha esposa Lívia por ter estado, antes longe e agora perto, sempre ao meu lado me dando apoio e forças para continuar nessa batalha, bem como por toda paciência e carinho.

Agradeço a minha família por sempre me apoiar em todos os meus sonhos, seja lá qual forem.

Agradeço a minha orientadora Cynthia Horn, por todo o aprendizado nestes últimos períodos de minha trajetória estudantil, bem como por todo apoio, auxílio e incentivo para que eu não desistisse desse trabalho.

Agradeço a Dra. Vânia Bonato, da USP de Ribeirão Preto, pela colaboração e por ter cedido todo apoio e infraestrutura que foram imprescindíveis para a realização desse trabalho.

Agradeço ao Dr. Célio Silva, da USP de Ribeirão Preto, pela colaboração e por ter cedido toda infraestrutura de seu laboratório e do laboratório Nível III, onde foi manipulada a cepa virulenta de *M. tuberculosis*.

Agradeço a Dra. Denise Fonseca, da USP de Ribeirão Preto, por todos os ensinamentos, conversas e apoio em prol desse grande projeto.

Agradeço a Livia Campos e Ana Flávia Gembre, da USP de Ribeirão Preto, por todo apoio técnico-científico e conversas jogadas fora.

Agradeço ao Dr. Célio Lopes Silva, da USP de Ribeirão Preto, e Ana Paula Masson, membro da sua equipe, pelo encapsulamentos da vacina APA e por todo apoio técnico.

Agradeço a Andreia Pires e todos do Laboratório FONTE, pelo apoio e atenção na análise das minhas lâminas de HE.

Agradeço a Cynthia Cascabulho, Márcio Mantuano e Andreia Lamoglia pela ajuda e atenção na aquisição das amostras no Citômetro de Fluxo.

Agradeço aos técnicos Marcos Almeida e Francisco Rodrigues, Serviço de Anatomia Patológica-IPEC, por todo apoio na preparação e coloração das lâminas de HE

Agradeço a estatística Elizabeth Albuquerque, pelo apoio nas análises estatísticas.

Agradeço aos doutores Denise Moraes da Fonseca Fonseca, Rosely Maria Zancopé Oliveira, Maria da Glória Bonecini de Almeida e Alan Jefferson Guimarães por receberem com muito carinho o convite a fazerem parte da minha banca.

E por fim, agradeço a mim mais uma vez por ter terminado esse trabalho que, mesmo que tenha dado muito trabalho, muitas viagens de ida e volta de Ribeirão Preto, finalmente consegui!

“... Propter hoc confitebor tibi in
gentibus et nomini tuo cantabo”.

- Romanos 15, 9b -

RESUMO

A tuberculose (TB) é responsável por dois milhões de mortes a cada ano, apesar da ampla utilização da vacina BCG (Bacilo Calmette-Guérin). Embora essa vacina não proteja contra a TB pulmonar no adulto, protege contra as formas graves da TB na infância. Para muitos autores, a imunização heteróloga (*prime-boost*) talvez seja uma das estratégias mais importantes e realistas para o controle da TB, principalmente nos países endêmicos. Muitos estudos têm demonstrado que a imunização com BCG seguido de reforço com vacina gênica (genes de *M. tuberculosis*) induz melhor proteção contra TB do que somente a vacina BCG. Além disso, a estratégia *prime-boost* utilizando microesferas biodegradáveis parece ser uma imunização promissora para estimular a resposta imune de longa duração. A glicoproteína APA foi identificada como importante antígeno imunodominante, induzindo níveis significativos de proteção contra *M. tuberculosis*. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia protetora da imunização heteróloga em modelo experimental de TB. Para isso, camundongos BALB/c foram imunizados por via subcutânea com BCG seguido de um reforço por via intramuscular com a formulação vacinal contendo *apa* e DMT co-encapsulados em microesferas (BCG/APA). Essa estratégia *prime-boost* foi eficiente na indução da resposta imune protetora à infecção por *M. tuberculosis*, caracterizada pela redução significativa do número de bacilos no pulmão destes animais na fase mais tardia da infecção (70 dias após desafio). Além de ser significativamente mais imunogênica que a vacina BCG, permitiu uma melhor preservação do parênquima pulmonar, com redução do número e tamanho dos granulomas, limitando a extensão da injúria tecidual induzida pela infecção e restringindo a inflamação no tecido alveolar. A potencialização do efeito protetor da vacina BCG induzida pelo reforço com a vacina pVAX*apa*+DMT-Me sugere que a estratégia utilizada pode ser importante para a prevenção da TB.

Palavras-chave: 1.Tuberculose 2.Vacinas de DNA 3.Imunização Heteróloga 4.Microesferas 5.APA.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is responsible for two millions of deaths each year despite the widespread use of BCG vaccine (Bacillus Calmette-Guérin). Although this vaccine does not protect against adult pulmonary TB, it is protective against severe forms of childhood TB. For many authors, heterologous prime-boost regimen is perhaps the most realistic strategy for future TB control, especially in endemic countries. Many studies have demonstrated that BCG-prime DNA-(*M. tuberculosis* genes)-booster induce greater protection against TB than BCG alone. APA glycoprotein has been identified as major immunodominant antigen and induces significant levels of protection against *M. tuberculosis*. Moreover, prime-boost strategy by using biodegradable microspheres seems to be a promising immunization to stimulate long lasting immune response. Thus, this study had as aim to investigate the immune protection against *M. tuberculosis* challenge in mice based on BCG priming and DNA vaccine boosting. For that, BALB/c mice were inoculated subcutaneously with a heterologous BCG priming-DNA boosting immunization using pVAX*apa* and TDM co-encapsulated in microspheres (BCG/APA), intramuscularly. This prime-boost strategy was effective in inducing protective immune response against *M. tuberculosis* infection, characterized by significant lower numbers of bacilli in the lungs of these animals, in the late phase of infection (70 days after infection). In addition to being significantly more immunogenic than BCG, it allowed better preservation of the lung parenchyma and reduction in the number and size of granulomas, limiting the extent of lung injury induced by infection and inflammation in the alveolar tissue. The improvement of the protective effect of BCG vaccine mediated by pVAX*apa* booster suggests that our strategy can be important in the treatment for prevention of TB.

Keywords: 1.Tuberculosis. 2.DNA vaccines. 3.Prime-Boost. 4.Microspheres. 5.APA.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Painel de número estimado de casos incidentes de TB no mundo no ano de 2009.	5
Figura 2 – Avaliação do número de UFC presentes nos pulmões dos animais imunizados por diferentes estratégias vacinais.	40
Figura 3 – Proteção esplênica contra TB experimental conferida por diferentes estratégias vacinais.	42
Figura 4 – Avaliação histopatológica dos pulmões dos animais imunizados por diferentes estratégias vacinais frente infecção por <i>M. tuberculosis</i>	46
Figura 5 – Avaliação histopatológica dos pulmões dos animais imunizados por diferentes estratégias vacinais frente infecção por <i>M. tuberculosis</i>	48

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Vacinas micobacterianas candidatas testadas em ensaios clínicos (Tabela adaptada de Kaufmann, 2010; Kaufmann <i>et al.</i> , 2010).....	18
Tabela 2 - Vacinas de subunidades e vetorizadas candidatas (Tabela adaptada de Kaufmann, 2010; Kaufmann <i>et al.</i> , 2010).....	21
Tabela 3 - Desenho experimental e construções vacinais.....	35
Tabela 4 - Divisão dos lóbulos pulmonares nos procedimentos experimentais.....	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ag	Antígeno
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês, <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
ANOVA	Análise da variância
APA	Antígeno Alanina Prolina (do inglês, <i>Alanine Proline Antigen</i>)
APC	Célula Apresentadora de Antígeno (do inglês, <i>Antigen-Presenting Cell</i>)
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
CD	Grupo de Diferenciação (do inglês, <i>Cluster of Differentiation</i>)
CD3	Molécula de superfície de linfócitos T
CD4	Molécula acessória presente na membrana de linfócitos T auxiliares, monócitos/macrófagos e células dendríticas
CD44	Glicoproteína de superfície envolvida na adesão e migração de linfócitos
CD45RA	Molécula expressa na superfície de todas as células de origem hematopoiética, mas predominantemente em linfócitos T virgens
CD62L	Molécula de adesão membro da família das L-selectinas
CD8	Molécula acessória presente na membrana de linfócitos T com atividade citotóxica, células NK e células dendríticas
CMI	Imunidade Mediada por Células (do inglês, <i>Cell-Mediated Immunity</i>)
CTL	Linfócito T Citotóxico (do inglês, <i>Cytotoxic T lymphocyte</i>)
DO	Densidade Óptica
DC	Célula Dendrítica (do inglês, <i>Dendritic Cell</i>)
DMT	Dimicolato de Trealose
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DTH	Hipersensibilidade do Tipo Tardio (do inglês, <i>Delayed Type Hypersensitivity</i>)
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético (do inglês, <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>)
ELISA	Ensaio Imunoenzimático ligado à Enzima (do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)

ESAT-6	Antígeno de 6 kDa Precocemente Secretado (do inglês, <i>6 kDa Early Secretory Antigenic Target</i>)
FAP	Proteína de Ligação à Fibronectina (do inglês, <i>Fibronectin Attachment Protein</i>)
FC	Filtrado de Cultura
Fc	Porção constante de cadeias pesadas de imunoglobulinas
FSC	Dispersão Frontal (do inglês, <i>Forward Scatter</i>)
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos-Macrófagos (do inglês, <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês, <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
Hsp	Proteína de Choque Térmico (do inglês, <i>Heat shock protein</i>)
IFN- γ	Interferon - gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
kDa	Kilodaltons
LAM	Lipoarabinomanana
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócito-1 (do inglês, <i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i>)
MDR	Multi-droga Resistente (do inglês, <i>Multiple-Drug-Resistant</i>)
Me	Microesfera
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês, <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MIP-1	Proteína Inflamatória de Macrófago 1 (do inglês, <i>Macrophage Inflammatory Protein 1</i>)
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MVA	Vírus Vaccínia Ancara (do inglês, <i>Modified Vaccinia Ankara</i>)
NK	Célula Matadora Natural (do inglês, <i>Natural Killer</i>)
NO	Óxido Nítrico (do inglês, <i>Nitric Oxid</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	Padrão Molecular Associado a Patógenos (do inglês, <i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>)
PBS	Tampão Fosfato Salino (do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i>)

PLGA	Poliéster dos ácidos láctico e glicólico (do inglês, <i>poly(lactide-co-glycolide)</i>)
PPD	Derivado Protéico Purificado (do inglês, <i>Purified Protein Derivative</i>)
RANTES	Regulador da Atividade Normal de célula T Expressa e Secretada
rBCG	Bacilo Calmette-Guérin recombinante
RD1	Região de Diferença 1 (do inglês, <i>Region of Difference 1</i>)
RM	Receptor de Manose
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês, <i>Ribonucleic Acid</i>)
RPMI	Meio líquido para cultura de células (Roswell Park Memorial Institute)
SCID	Imunodeficiência Combinada Severa (do inglês, <i>Severe Combined Immunodeficiency</i>)
SFB	Soro Fetal Bovino
SPF	Livre de Patógenos Específicos (do inglês, <i>Specific Pathogen Free</i>)
SSC	Dispersão Lateral (do inglês, <i>Side Scatter</i>)
TB	Tuberculose
DMT	6'6-Dimicolato de Trealose
Th1	Denominação alternativa para os linfócitos T CD4 inflamatórios
Th2	Denominação alternativa para os linfócitos T CD4 auxiliares
TLR	Receptores do tipo Toll (do inglês, <i>Toll-Like Receptors</i>)
TMB	3',3',5',5'-tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral - alfa
Tween 20	Polioxietileno-20-sorbitan
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1 REVISÃO DA LITERATURA	4
1.1 Tuberculose: um problema de saúde pública	4
1.2 A ativação do sistema imune na tuberculose.....	5
1.3 O modelo murino na tb	11
1.4 Desenvolvimento de vacinas contra TB.....	13
1.4.1 BCG: eficácia da vacina atual	13
1.4.2 Novas vacinas contra TB.....	14
1.4.2.1 Vacinas promissoras à substituição do BCG.....	16
1.4.2.2 Vacinas de subunidades como reforço ao BCG.....	18
1.4.2.3 Vacinas Terapêuticas	21
1.4.3 Vacinas de DNA (vacinas gênicas)	22
1.4.4 Sistema de liberação eficaz: microesferas poliméricas	24
1.4.5 Adjuvante DMT: um grande imunomodulador	25
1.4.6 Imunização heteróloga: uma imunização promissora.....	26
1.4.7 O antígeno APA (<i>Alanine Proline Antigen</i>)	28
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo Geral.....	31
2.2 Objetivos Específicos.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Animais	32
3.2 Bactérias.....	32
3.3 Obtenção e encapsulamento dos plasmídeos de DNA.....	33
3.4 Preparação das microesferas	34
3.5 Imunização, grupos experimentais e infecção	34
3.6 Coleta dos órgãos.....	35
3.6.1 Baço	35

3.6.2 Pulmão	36
3.7 Determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC).....	37
3.8 Análise histopatológica do pulmão.....	37
3.9 Análise estatística	38
4 RESULTADOS	39
4.1 Avaliação da eficácia protetora da vacina gênica pvaxapa-dmt-me após infecção por <i>M. tuberculosis</i>	39
4.2 Avaliação histopatológica dos pulmões dos animais imunizados frente infecção por <i>M. tuberculosis</i>	43
5 DISCUSSÃO.....	49
6 CONCLUSÕES.....	57
7 REFERÊNCIAS	58

INTRODUÇÃO

O controle da tuberculose (TB), a qual representa uma das mais importantes causas de morbi-mortalidade por doença infecciosa no mundo e é responsável por aproximadamente 2 milhões de mortes por ano, é feito preventivamente pela vacina Bacilo Calmette-Guérin (BCG). Uma vantagem importante desta vacina é a proteção contra formas graves da doença na infância, entretanto, foi observado que o efeito protetor do BCG pode diminuir com o avanço da idade, com sua eficácia variando de acordo com a população estudada, o que é particularmente grave nas áreas endêmicas (Colditz *et al.*, 1994; Fine *et al.*, 1995; Reece & Kaufmann, 2008; WHO, 2010). Assim, a alta incidência da TB no mundo e a eficácia controversa do BCG nos remetem à necessidade de uma nova vacina para o controle dessa doença.

As vacinas gênicas representam uma alternativa importante na obtenção de uma proteção efetiva e duradoura, induzindo resposta imune celular Th1 requerida para proteção contra patógenos intracelulares, como por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis*. Essas vacinas possuem a vantagem de serem estáveis, de fácil e relativamente baixo custo de produção e podem ser utilizadas inclusive em indivíduos imunossuprimidos (Henke, 2002). Além disso, são baseadas na hipótese de que poucos genes/antígenos seriam suficientes para induzir e manter a resposta imune protetora (Andersen, 2001). Portanto, incluir genes/antígenos que melhorem as respostas benéficas e excluam componentes deletérios potenciais significaria a grande vantagem trazida por essas vacinas.

Proteínas antigênicas provenientes de filtrado de cultura (FC) de *M. tuberculosis* são utilizadas na maior parte das vacinas testadas contra TB como indutoras de imunidade protetora, sendo capazes de ativar linfócitos T essenciais à resistência anti-infecciosa (Andersen, 1994). Entre as proteínas estudadas figura o antígeno APA (do inglês Alanine Proline Antigen), isolado a partir do FC de *M. tuberculosis* pela sua capacidade de ser reconhecido pelos linfócitos T e anticorpos de cobaias imunizadas com micobactérias vivas (Romain *et al.*, 1993; Laqueyrie *et al.*, 1995; Horn *et al.*, 1999). Do mesmo modo, foi demonstrado que este antígeno é capaz de induzir resposta imune celular em cobaias, assim como resposta imune humoral tanto em pacientes com TB pulmonar ativa quanto em indivíduos expostos ao *M. tuberculosis* (Diagbouga *et al.*, 1997; Romain *et al.*, 1999). Além disso, foi

demonstrado que o gene da APA é capaz de induzir resposta imune Th1 e Th2, assim como efeito protetor significativo contra um desafio por *M. tuberculosis* em modelo experimental (Garapin *et al.*, 2001).

Os adjuvantes são importantes na potencialização da imunogenicidade induzida pelo antígeno e, em particular no desenvolvimento de vacinas contra TB, a utilização daqueles capazes de induzir preferencialmente resposta imune Th1 é indicada. Nesse contexto, o 6,6'-dimicolato de trealose (DMT), um glicolípido presente na parede celular do *M. tuberculosis*, é um candidato atraente a ser utilizado em formulações vacinais. Além de suas propriedades imunoestimulatórias, que favorecerem a ativação de macrófagos e a produção de citocinas Th1 (Lima *et al.*, 2001), esse imunomodulador mimetiza em parte a infecção induzida por *M. tuberculosis*, incluindo a formação de granulomas e produção de citocinas pró-inflamatórias (Perez *et al.*, 1994; Geisel *et al.*, 2005), efeito este obtido sem a inoculação da micobactéria.

As microesferas biodegradáveis, constituídas dos ácidos láctico e glicólico, representam uma estratégia interessante a ser empregada no processo de vacinação. Essas podem atuar como mediadores de transfecção de DNA direcionada às células fagocíticas, bem como a sua proteção contra degradação biológica pelas nucleases, atuando também como estímulo pró-inflamatório, minimizando a toxicidade sistêmica, que é um ponto importante a ser considerado em termos de vacinação com DNA (Wang *et al.*, 1999).

A imunização heteróloga (do inglês, *prime-boost*) envolve a administração de diferentes vacinas inoculadas em intervalo de tempos diferentes. O mesmo antígeno pode ser administrado em formulações diferentes ou a mesma vacina administrada por vias diferentes, levando ao aumento significativo da resposta imune pela contínua estimulação do sistema imune. Uma vez que a imunização homóloga geralmente aumenta o nível da resposta imune a um número limitado de epítopos, combinações heterólogas podem melhorar não só a magnitude da resposta, mas também implicar um número maior de epítopos, potencializando a multifuncionalidade das células T e dos anticorpos (McShane & Hill, 2005; Seder *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008). Neste tipo de estratégia observa-se, preferencialmente, a expansão de células T de memória específicas, pré-existentes, contra epítopos

antigênicos compartilhados tanto pela primeira dose (*prime*) quanto pelo seu reforço (*boost*) (Skeiky & Sadoff, 2006). Estudos relatam que a utilização de BCG como *prime* e, posteriormente, um *boost* com uma vacina gênica seria uma escolha bastante promissora, não somente por razões científicas, mas também pelo fato da vacinação com BCG ser utilizada em crianças em vários países onde a TB é endêmica e a maioria da população é vacinada (Rouanet & Loch, 2010).

Baseado nessas estratégias vacinais, nós avaliamos inicialmente a imunogenicidade da APA, formulada numa vacina gênica, em modelo murino e constatamos que esta vacina, pVAX_{apa}-DMT-Me, administrada como reforço do BCG num contexto de imunização heteróloga, mostrou-se imunogênica, induzindo forte resposta imune Th1 e Th2, estimulando a produção tanto de IgG2a quanto de IgG1 FC-específicos, além de níveis elevados de IFN- γ e baixos de IL-4 no sobrenadante de cultura de esplenócitos estimulados com FC. Da mesma forma, verificamos um aumento na frequência de células T CD4⁺ efectoras de memória (CD4⁺CD44^{high}CD62L^{low}) no baço dos animais imunizados com esta estratégia em comparação à vacina atual BCG, 30 dias após a última imunização (Carlétti *et al.*, 2008). Portanto, estes resultados nos levaram a estudar a proteção induzida por este sistema de imunização após infecção com uma cepa virulenta de *M. tuberculosis*.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 TUBERCULOSE: UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a TB atingiu entre os anos de 1850 e 1950 um bilhão de mortes e, somente na década passada, houve 90 milhões de novos casos e 30 milhões de mortes (WHO, 2006). Em 1993, a OMS declarou a situação da TB como estado de emergência criando o programa "STOP TB", conseguindo assim mais recursos para amplificar as atividades de pesquisas e de controle desta doença (Ruffino-Netto, 2002).

Apesar da TB ser uma doença curável em aproximadamente 93% dos casos, a OMS divulgou em 2005 que de todos os casos de TB no mundo, cerca da metade (quatro milhões/ano) não receberam sequer tratamento (WHO, 2005). Muitos indivíduos infectados permanecem saudáveis, entretanto, sem que haja erradicação total do patógeno, conseqüentemente permanecendo infectados - forma latente da doença - por muitos anos. Desse modo, estima-se que 1/3 da população mundial, ou seja, aproximadamente 2,2 bilhões de indivíduos estejam infectados por *M. tuberculosis* e, portanto com maior risco de adoecer por reativação (WHO, 2010).

Segundo dados recentes da OMS, aproximadamente 14 milhões de casos prevalentes (variação de 12 a 16 milhões) de TB foram diagnosticados em 2009, equivalentes a 200 casos por 100.000 habitantes. Dos 22 países responsáveis por 80% do peso mundial da TB, 9 fazem parte do Continente Africano, fenômeno ligado principalmente às altas taxas de co-infecção TB-HIV (Ministério da Saúde, 2010; WHO, 2010 - Fig. 1).

O Brasil ocupa atualmente o 19º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos no mundo. Apesar das taxas de incidência e mortalidade por TB permanecerem em declínio, estima-se que 57 milhões de indivíduos estejam infectados com o bacilo e que cerca de 72.000 casos novos e 4.700 óbitos ocorram anualmente, com ênfase em 181 dos 5.564 municípios brasileiros, que concentram 60% dos casos no país (Ministério da Saúde, 2010).

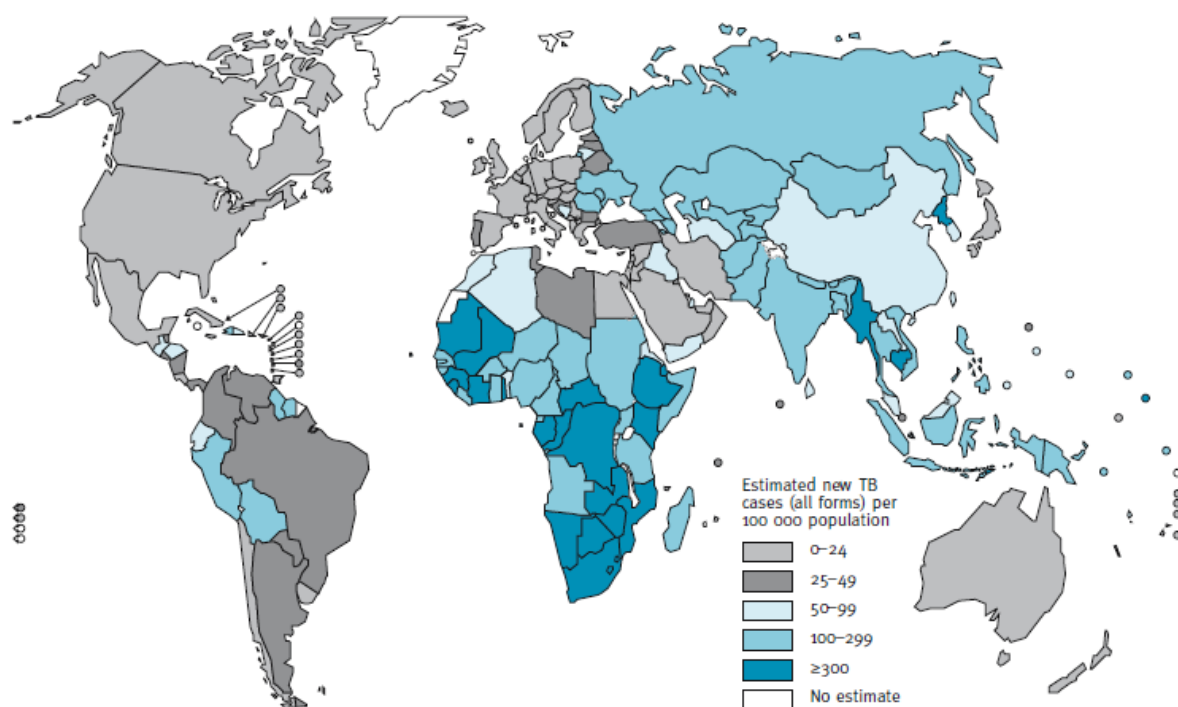


Figura 1 – Painel de número estimado de casos incidentes de TB no mundo no ano de 2009. (Figura adaptada de WHO report 2010).

Segundo o programa STOP TB, as metas adicionais para 2015 consistem em reduzir pela metade a prevalência da TB e as taxas de mortalidade no mundo em comparação com o ano de 1990. O objetivo a longo prazo é eliminar a doença reduzindo a incidência anual para menos de um caso novo por um milhão de indivíduos em 2050, através das vacinas contra TB que estão atualmente em estudo (Dye *et al.*, 2006; Kaufmann *et al.*, 2010).

1.2 A ATIVAÇÃO DO SISTEMA IMUNE NA TUBERCULOSE

M. tuberculosis é uma micobactéria de desenvolvimento intracelular facultativo, tendo predileção pelo tecido pulmonar, rico em oxigênio (Collins & Kaufmann, 2001). Este bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) está filogeneticamente bem próximo das bactérias Gram-positivas. Possui parede celular constituída por três camadas principais, envolvidas na regulação da resposta imune do hospedeiro: a membrana plasmática, rica em lipopolissacarídeos; uma camada intermediária

formada por um complexo de peptidoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos; e mais externamente por uma cápsula rica em polissacarídeos (Crick *et al.*, 2001).

A fonte de infecção por *M. tuberculosis* é o ser humano que elimina grande número de bacilos principalmente pelo trato respiratório. Os contatos próximos e uma exposição maciça tornam a transmissão altamente provável. Quando um indivíduo com TB pulmonar tosse, *M. tuberculosis* é espalhado no ambiente em forma de aerossóis, permanecendo no ar por períodos prolongados e ao serem inalados ultrapassam o bronquíolo terminal, alcançando o bronquíolo respiratório, onde residem células dendríticas (CD), macrófagos, presentes no parênquima e macrófagos alveolares (Frieden *et al.*, 2003; Russel, 2007).

A natureza da resposta imune dependerá da interação tanto das moléculas de superfície das micobactérias quanto dos receptores de reconhecimento padrão (PRR) das células da imunidade inata. Os PRR reconhecem estruturas frequentemente encontradas, chamadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), produzidas por microrganismos e facilitam as respostas imunes inatas contra os microrganismos. Esses receptores incluem componentes do sistema complemento (CR3 e CR4), receptores da porção constante de IgG (Fc γ R) que reconhecem o complexo anticorpo-micobactéria (Greenberg, 1999); receptores de lectinas tipo C (Dorhoi & Kaufmann, 2009) e receptores de manose (RM) (Pugin *et al.*, 1994).

A internalização do bacilo pelas células fagocíticas pode levar a ativação destas células ou destruição do bacilo. Os macrófagos infectados induzem resposta inflamatória local levando ao recrutamento de células mononucleares do sangue periférico que, por sua vez, tornam-se alvos potenciais para a infecção (Cooper, 2009). Dentro do compartimento fagossomal, a micobactéria emprega estratégias de evasão da resposta imune incluindo a neutralização do pH do fagossoma, impedindo sua acidificação (Russel, 2007); o escape de *M. tuberculosis* para o citosol, esquivando-se dos mecanismos efetores fagossomais (van der Wel, 2007); a inibição da apoptose através da produção de prostaglandinas e promoção da morte celular por necrose pelo bacilo (Divangahi *et al.*, 2010); a limitação das CDs infectadas em migrar para os linfonodos drenantes e iniciar a ativação das células T, devido a produção autócrina de IL-10 e supressão da produção de IL-12 (Cooper,

2009); o bloqueio da apresentação cruzada dos antígenos micobacterianos pelas CDs, através da modulação da via 5-lipoxigenase, o que inibe a produção de prostaglandina E(2), impedindo assim o início da imunidade celular T (Divangahi *et al.*, 2010); e a interferência no processo da apresentação antigênica, inibindo o processamento das moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II, o que impede a ativação das células T CD4⁺, via TLRs 1 e 2 (Harding & Boom, 2010; Lancioni, 2011). Portanto, as bactérias utilizando essas estratégias de fuga do sistema imune conseguem sobreviver dentro dos macrófagos e começam a se multiplicar após um período de latência (Dannenbergh, 1991; Frieden *et al.*, 2003; Russel, 2007).

O recrutamento de linfócitos ativados para a superfície da mucosa epitelial provavelmente é um dos mecanismos mais importantes da defesa do hospedeiro e do subsequente desenvolvimento de doença inflamatória no local. Durante a fase que precede a instalação da imunidade específica, as micobactérias podem se disseminar, por via linfática, através dos gânglios regionais. Portanto, após terem transitado pelo canal torácico, podem alcançar diferentes órgãos (rins, gânglios, etc.) por via hematogênica, produzindo assim as lesões secundárias (Davis & Ramakrishnan, 2009; Krishnan *et al.*, 2010). No sítio das infecções tuberculosas ocorre a formação de um importante marcador imunopatológico na resposta imune do hospedeiro, o granuloma. Esta estrutura representa uma barreira física, limitando a disseminação dos bacilos e o desenvolvimento da infecção.

O granuloma é constituído de uma área central de macrófagos infectados, rodeados por macrófagos fusionados, denominados células gigantes, circundados por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em associação com tecido fibroso, constituído de colágeno e outros componentes da matriz extracelular, delimitando a periferia da estrutura. No centro caseoso sólido o bacilo poderá sobreviver, porém não se multiplicar, mas quando escapam são fagocitados pelos macrófagos viáveis mais próximos. Se estas células não forem previamente ativadas, os bacilos se multiplicam intracelularmente e uma resposta imune citotóxica leva a sua morte (e de tecidos vizinhos) aumentando assim o centro caseoso. Em indivíduos com baixa ativação dos macrófagos (como por exemplo, os indivíduos imunocomprometidos) este processo é repetido, levando aos poucos a destruição do pulmão. Em indivíduos imunocompetentes, que apresentam uma boa ativação dos macrófagos, o

centro caseoso torna-se envolvido por esses macrófagos ativados, os quais ingerem e destroem os bacilos que escapam do caseo. Esse processo pode controlar a doença na fase assintomática. No interior do tubérculo os bacilos podem, entretanto permanecer “dormentes” durante vários meses ou anos e se multiplicar no caso de uma imunodepressão do hospedeiro. Esta nova infecção é classificada como reativação e conduz a uma liquefação do caseo. Na liquefação do granuloma, as micobactérias irão proliferar-se até atingir números bastantes altos, conduzindo assim ao recrutamento de novas células ao local da infecção. A resposta imune citotóxica a esses bacilos e aos seus produtos leva a uma intensa inflamação, necrose caseosa, incluindo erosões da parede dos bronquíolos, resultando na formação de cavernas. Dessas cavidades, as micobactérias são disseminadas para outros pontos do pulmão e para o ambiente, podendo então contaminar outros indivíduos garantindo assim a preservação de sua espécie (Dannenberg, 1993, 1994; Tsai e col., 2006; Russel, 2007, 2009).

A imunidade protetora contra TB é de natureza celular. Todos os mecanismos possíveis de destruir o bacilo são resultantes de uma série de interações ocorridas entre os linfócitos e os fagócitos do hospedeiro, mediadas principalmente por citocinas.

Embora muitas células desempenhem um importante papel na defesa contra *M. tuberculosis*, o linfócito T CD4⁺ é uma das células efetoras importantes na imunidade mediada por células na TB. Essas células expressam receptores celulares $\alpha\beta$, que reconhecem antígenos apresentados no contexto MHC de classe II e ajudam a amplificar a resposta imune do hospedeiro, ativando células efetoras e recrutando mais células quando necessário. Os linfócitos T CD4⁺ auxiliares podem ser diferenciados em células produtoras de citocinas de perfil Th1, críticas para eliminação de *M.tb*, sendo esse processo dependente de IL-12 (Zhang *et al.*, 1999; Schluger & Rom, 1998; Kaufmann, 2001).

A IL-12 é uma citocina chave na resposta imune do hospedeiro contra o *M. tuberculosis*, sendo produzida principalmente por células fagocíticas (Ladel *et al.*, 1997). Os macrófagos e, principalmente, as CDs infectados secretam IL-12, citocina esta que irá sensibilizar as células NK (do inglês *Natural Killer*) a secretarem IFN- γ logo no início da infecção (Henderson *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999). Essa citocina

é descrita como fator dominante na diferenciação de células Th1 a partir da célula virgem precursora T CD4⁺ (Trinchieri, 1995). Essa diferenciação é mediada pela expressão do fator de transcrição T-bet, o qual regula negativamente a expressão de GATA-3, o principal regulador da diferenciação de células Th2, além de regular positivamente a expressão do gene do IFN- γ , aumentando a expressão de receptores para IL-12 (Usui *et al.*, 2006).

O IFN- γ é uma citocina-chave no controle da infecção por *M. tuberculosis* e está relacionada com a ativação dos macrófagos a produzirem radicais de oxigênio e nitrogênio (envolvidos na destruição ou inibição do crescimento de *M. tuberculosis*), bem como TNF- α , que desempenha um papel fundamental na formação do granuloma (Cooper *et al.*, 1993; Flynn *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1999). Embora a produção isolada de IFN- γ seja insuficiente para o controle do bacilo, essa citocina é um dos componentes cruciais para a resposta protetora contra o patógeno (Ottenhoff *et al.*, 1998), o que foi demonstrado em experimentos com camundongos deficientes de IFN- γ , verificando que esses animais foram mais susceptíveis à infecção por uma cepa virulenta de *M. tuberculosis* do que o grupo selvagem, levando ao desenvolvimento de uma doença mais grave e a um aumento na mortalidade em relação a esses animais (Cooper *et al.*, 1993; Flynn *et al.*, 1993). Embora IFN- γ ainda seja considerado o melhor parâmetro para se correlacionar proteção, concentrações elevadas dessa citocina não necessariamente significam melhor proteção na tuberculose experimental (Fonseca *et al.*, 2007).

A resposta Th1 consiste basicamente na produção de citocinas como IFN- γ e IL-2, que auxiliarão o macrófago a lutar contra o bacilo, resultando na eliminação do bacilo e na formação do granuloma fibrosado (Rook, 2007). No entanto, no modelo murino cerca de 20 a 40 dias após o controle da infecção, o linfócito T CD4⁺ começa a produzir IL-4, que é uma citocina ligada à resposta linfocitária do tipo Th2 (Orme *et al.*, 1993), assim como, produzem IL-5, IL-9 e IL-13. Essas citocinas estão envolvidas na inibição dos linfócitos Th1 e das células NK, e também no direcionamento de uma ativação inapropriada de macrófagos, induzindo um tipo de imunidade que, no caso da TB, corresponde à evolução para a doença (Rook, 2007).

O papel da IL-10 na tuberculose ainda é controverso. Diversos trabalhos mostraram que a progressão da infecção foi similar entre animais normais e deficientes para IL-10 (Erb *et al.*, 1998; Jung *et al.*, 2003; Sheil *et al.*, 2006). Entretanto, animais transgênicos para IL-10 foram mais susceptíveis à infecção por *M. tuberculosis* (Turner *et al.*, 2002). Em camundongos da linhagem C57BL/6, a presença de IL-10 parece não comprometer o controle da infecção. Entretanto, nos animais BALB/c, foi observado um aumento nas concentrações de IL-10 na fase tardia que pode comprometer as funções mediadas por IFN- γ , uma vez que esses animais não controlam a infecção nesse período (Paula *et al.*, 2009).

Recentemente, outras subpopulações de células T funcionais implicadas na imunidade micobacteriana foram identificadas como as células Th17 e as células T reguladoras (Treg). As células Th17 são geradas em presença das citocinas TGF- β e IL-6, sendo esse padrão associado a doenças auto-imunes sendo células relacionadas à indução de respostas inflamatórias (Sallusto & Lanzavecchia, 2009). Embora o papel dessas células na TB ainda não esteja totalmente esclarecido, essas parecem desempenhar um importante papel na formação inicial da imunidade protetora pulmonar, contribuindo para o recrutamento de células Th1 para o sítio infeccioso (Khader *et al.*, 2007; Khader & Cooper, 2008; Cooper, 2009). Por outro lado, as Treg podem ser geradas na presença de TGF- β , a qual pode ser secretada pelas células dendríticas imaturas, e exercer juntamente com a citocina IL-10, função supressora sob diversas populações de células T (Maloy *et al.*, 2001; Belkaid & Tarbell, 2009). Essas células estão fortemente associadas com a supressão da produção de IFN- γ (Ribeiro-Rodrigues *et al.*, 2006; Guyot-Revol *et al.*, 2006) e progressão da infecção (Scott-Browne *et al.*, 2008).

Notadamente, os linfócitos T CD8⁺ contribuem na defesa do hospedeiro, não só através da produção de citocinas, mas também pela atividade citotóxica mediada por perforina e granzima ou pela via que requer a ligação de CD95/CD95L, induzindo a morte de macrófagos infectados (Lewinsohn *et al.*, 1998; Serbina *et al.*, 2000). Em contraste às células T CD4⁺, essa população é requerida na ativação cruzada (Winau *et al.*, 2006). Esse processo consiste na apoptose de macrófagos infectados com *M. tuberculosis*, resultando em vesículas carregadas de antígenos micobacterianos que são fagocitadas pelas APCs vizinhas e apresentadas às células T CD8⁺ através do complexo MHC classe I (Winau *et al.*, 2005). Esse

processo também está sujeito à inibição através das estratégias de evasão bacteriana que utilizam as vias eicosanóides (Divangahi *et al.*, 2010). Além disso, a ativação das células T CD8+ também pode ser realizada através do escape de *M. tuberculosis* para o citosol, o que leva os antígenos diretamente às moléculas MHC de classe I (van der Wel *et al.*, 2007).

A participação da resposta humoral na TB permanece controversa. As células B e os anticorpos são considerados menos importantes na proteção contra a TB uma vez que, não possuem a capacidade de lisar e destruir o bacilo devido à localização preferencial dos mesmos no interior dos macrófagos, onde estão protegidos da ação das imunoglobulinas líticas (Johnson *et al.*, 1997; Turner *et al.*, 2001). Entretanto, alta frequência de células B está presente nas camadas periféricas do granuloma (Randhawa, 1990), em pequenos agregados com alta densidade celular, e circundados por linfócitos T CD4+ e CD8+ infiltrantes, formando estruturas celulares semelhantes aos folículos de órgãos linfoides secundários (Ulrichs *et al.*, 2004; Ulrichs & Kaufmann, 2006). Além disso, foi demonstrado que os antígenos micobacterianos induzem resposta imune humoral em humanos, sendo que vários destes foram identificados através do uso de anticorpos monoclonais (Bosio, 2000; Nicod, 2007). Estudos experimentais utilizando camundongos deficientes em células B e em células T, assim como a imunização passiva com anticorpos monoclonais e policlonais, e ensaios realizados com vacinação intramucosa demonstraram a interdependência essencial e a sinergia entre a imunidade celular e humoral (Abebe & Bjune, 2009).

1.3 O MODELO MURINO NA TB

Os modelos animais têm desempenhado um papel importante nos testes de diferentes vacinas candidatas, devido às semelhanças entre a fisiologia humana e animal, fornecendo informações valiosas sobre o sistema humano. O uso de modelos animais para pesquisa em TB possui uma longa história desde que Robert Koch utilizou pela primeira vez o modelo murino como um modelo experimental. Posteriormente, pesquisadores estabeleceram infecções em uma variedade de modelos animais, tais como, coelho, cobaia, camundongo, primata não-humano, etc.

Dentre estes, modelos experimentais de TB pulmonar como camundongos e cobaias são amplamente utilizados e fornecem inúmeras informações sobre a resposta imune pulmonar do hospedeiro, assim como mudanças na imunopatologia e no efeito protetor de novos candidatos vacinais no mundo (Gupta & Katoch, 2005).

O modelo murino é um dos mais freqüentemente utilizados e podem ser facilmente infectados através de aerossóis com uma dose baixa de microrganismos, multiplicando-se nos pulmões e, posteriormente, espalhando-se para o fígado e baço. A infecção é controlada pela CMI, porém não eliminada, principalmente através de resposta de células T, podendo prevalecer por mais de um ano em algumas linhagens de camundongos (Flynn & Chan, 2001). Nesse estudo, utilizamos camundongos BALB/c que, assim como a linhagem C57BL/6, é muito utilizada no estudo da tuberculose experimental, devido sua capacidade de inibir o crescimento dos bacilos nos pulmões, mantendo a estabilidade da infecção (Jung *et al.*, 2009). A resposta imune a esses animais possui correlação direta ao sistema humano, incluindo a ativação das células T CD4+ pelas APCs infectadas (Caruso *et al.*, 1999; Scanga *et al.*, 2000); produção de IL-12, polarizando resposta Th1 (Cooper *et al.*, 1997; de Jong *et al.*, 1998); e produção de TNF- α , importante limitação da patologia da TB (Flynn *et al.*, 1995; Bean *et al.*, 1999; Mohan *et al.*, 2001).

A principal vantagem do modelo murino no desenvolvimento de uma vacina está na possibilidade de se testar um grande número de vacinas a baixo custo, e avaliar seu efeito protetor (Gupta & Katoch, 2005). Entretanto, a natureza da proteção encontrada nos resultados não pode ser extrapolada diretamente aos seres humanos. O processo de formação de granulomas em camundongos após infecção por *M. tuberculosis* é diferente do observado em humanos, bem como em outros hospedeiros naturalmente sensíveis como, por exemplo, as cobaias (Turner *et al.*, 2003), devido sua resistência inata à TB e forte geração de respostas celulares contra a infecção que, por sua vez, controla o crescimento dos bacilos, bem como a progressão da doença (Kaplan *et al.*, 2003). Portanto, o modelo murino é importante na realização de estudos imunológicos da TB, considerados adequados para a seleção de primeira ordem de candidatos vacinais, principalmente para a avaliação da eficácia protetora destes candidatos. No entanto, as vacinas que apresentarem boa proteção nesse modelo deverão então ser avaliadas em outros modelos experimentais.

1.4 DESENVOLVIMENTO DE VACINAS CONTRA TB

1.4.1 BCG: eficácia da vacina atual

A pesquisa em busca de uma vacina contra a TB iniciou-se 110 anos atrás com grandes expectativas. Robert Koch, oito anos após ter descoberto o bacilo da TB em 1882, desenvolveu uma vacina de subunidade para o tratamento da TB, doença que naquela época constituía a pior ameaça para a espécie humana. Esta vacina terapêutica falhou completamente. A segunda tentativa foi iniciada 10 anos mais tarde pelos cientistas franceses Albert Calmette e Jean Camille Guérin no Instituto Pasteur. Após mais de 231 passagens, obtiveram uma cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, agente etiológico da TB bovina, a qual pode, raramente, causar doença em humanos (Fine, 1989; Kaufmann, 2001). Esta descoberta representou um marco importante no controle da TB no mundo.

Estima-se que mais de aproximadamente 4 bilhões de indivíduos já foram vacinados com a vacina BCG nos últimos 90 anos (Martin, 2005; Kaufmann *et al.*, 2010). Aproximadamente 115 milhões de doses são distribuídas a cada ano (Colditz *et al.*, 1994; Brewer & Colditz, 1995) atendendo a quase 80% das crianças ao redor do mundo (Fine *et al.*, 1999). Esta vacina apresenta uma série de vantagens, sobretudo, porque pode ser administrada em uma só dose logo após o nascimento, o que é eficaz na proteção contra as formas graves da TB (miliar e meningoencefálica) na infância, reduzindo consideravelmente a incidência da TB infantil em áreas endêmicas (Colditz *et al.*, 1995; Fine, 1995; Soysal *et al.*, 2005). Do mesmo modo, alguns estudos mostram que a incidência da TB foi de 3% quando a vacina é administrada logo após o nascimento e avaliada na idade de 3 anos (Sadoff, 2005; Hussey *et al.*, 2007; Trunz *et al.*, 2006). De fato, esta é uma importante forma de prevenção diminuindo a incidência da TB no mundo, uma vez que reduz em cerca de 50% o risco dessa doença (WHO, 2010).

Entretanto, alguns estudos demonstram eficácia limitada da revacinação com BCG em crianças e adultos (Roth *et al.*, 2010). A administração de uma ou duas doses dessa vacina no Malawi, por exemplo, não foi capaz de proteger contra a forma pulmonar da TB (Crampin *et al.*, 2009). Além disso, estudos brasileiros confirmaram que uma segunda dose de BCG não potencializa a eficácia protetora

dessa vacina (Rodrigues *et al.*, 2005; Barreto e col., 2006; Antas & Castello-Branco, 2008).

As razões desta variação na eficácia protetora da vacina contra a TB não são completamente entendidas. Possíveis explicações que têm sido estudadas incluem: (i) interferência na resposta imune ao BCG, podendo ser causada por exposições prévias a micobactérias ambientais; (ii) diferenças entre as sub-cepas vacinais de BCG; (iii) mudanças fenotípicas na vacina durante a passagem das culturas originais; (iv) deleção de antígenos protetores do BCG utilizado; (v) falha do BCG em estimular respostas anti-micobacterianas CD4⁺ e CD8⁺ adequadas e balanceadas; (vi) variabilidade na dose, via de administração, idade de administração e diferenças genéticas das diferentes populações vacinadas; e (vii) no processo de liofilização da vacina (Colditz, 1994; Brewer & Colditz, 1995; Fine *et al.*, 1999; Murphy *et al.*, 2008).

Devido ao risco de infecção nos indivíduos portadores do vírus da AIDS, por ser uma vacina constituída de microorganismos vivos (Hess & Kufmann, 2001), o Ministério da Saúde recomenda a vacinação com BCG em recém-nascidos assintomáticos, independente da exposição ao HIV no período do nascimento. Porém, nos indivíduos que apresentam sintomas da infecção pelo HIV a vacina não é recomendada, devido ao desenvolvimento de severas complicações relacionadas à vacina (Karpelowsky *et al.*, 2008). O BCG pode provocar nestes indivíduos aumento dos linfonodos na região da vacinação ou mais tardiamente levar à disseminação da doença, podendo afetar diferentes órgãos (Hesseling *et al.*, 2006). Desta forma, nas duas últimas décadas, diversas construções vacinais foram testadas em diferentes modelos experimentais (camundongos, cobaias e primatas não-humanos), no intuito de desenvolver modelos melhores que demonstrem eficácia vacinal em cenários mais realísticos que os atuais (Ginsberg, 2002; Izzo, 2005; Orme, 2005).

1.4.2 Novas vacinas contra TB

As etapas de teste das novas vacinas nos modelos experimentais é objeto de estudo atual, o que inclui também a busca de vacinas capazes de induzir uma resposta imune adequada contra *M. tuberculosis* e ao mesmo tempo capazes de

minimizar o dano causado pela própria resposta imune do hospedeiro (Izzo *et al.*, 2005; Orme, 2005; Kaufmann, 2010).

As novas estratégias de vacinação deverão aprimorar significativamente a resposta imune protetora induzida pelo BCG e ter um efeito importante no controle global da TB. Essa expectativa implica na necessidade de vacinas ou combinações de vacinas que induzam uma melhor imunidade que o BCG, não somente em crianças, mas também em adolescentes e adultos. Assim, vacinas candidatas que estão a caminho da sua aprovação para o uso em seres humanos visam a redução da TB através da utilização de duas estratégias.

Na primeira estratégia, as vacinas pós-exposição mantêm o foco no *M. tuberculosis* latente e auxiliam na eliminação do patógeno, durante sua fase dormente ou de replicação lenta da infecção, evitando assim mais tarde a reativação da TB. Para tal fim, muitos antígenos da fase de latência vêm sendo identificados e a busca de genes específicos ao estágio metabólico de *M. tuberculosis* tem sido muito facilitada pelo desenvolvimento de matrizes de expressão genômica (Betts *et al.*, 2002; Voskuil *et al.*, 2003; Lin & Ottenhoff, 2008). Na segunda estratégia, a utilização de novas combinações com administração primária do BCG (ou substitutos ao BCG) e um reforço com uma nova vacina têm como foco a erradicação de *M. tuberculosis*. Algumas dessas “vacinas-reforço” podem eventualmente ser consideradas como substitutas do BCG.

Na infância, a vacina ideal esperada seria àquela que impediria totalmente a infecção inicial. Até o presente momento, este objetivo não foi atingido, o que reflete à grande resistência da micobactéria extracelular aos mecanismos mediados por anticorpos, citocinas ou bacteriolíticos. Logo após a infecção, *M. tuberculosis* passa a se multiplicar dentro de macrófagos e pode ser destruído ou ter seu crescimento contido pela CMI. Assim, a maioria das estratégias de vacinação possui como objetivo a redução drástica da carga bacteriana inicial e a garantia de que as bactérias não possam utilizar suas estratégias de escape. Quando a imunidade é eficaz e conseqüentemente capaz de conter *M. tuberculosis*, o bacilo entra numa fase de latência, caracterizada por um metabolismo reduzido, apresentando um perfil de expressão gênica diferente daquele observado na fase mais precoce da infecção. Uma vacina que possui como alvo a fase latente seria importante, pois

agiria através de mecanismos imunológicos capazes de erradicar totalmente os bacilos presentes nessa fase, justificando a busca de antígenos predominantemente expressos durante a fase de dormência das bactérias.

A prevenção da reativação de *M. tuberculosis*, quando na sua fase latente, também pode depender da capacidade do hospedeiro em interferir rapidamente nas mudanças do padrão metabólico do patógeno, incluindo genes implicados na reativação. Assim, vacinas que impedem especificamente a reativação deverão reduzir consideravelmente o risco de recidiva da TB.

1.4.2.1 Vacinas promissoras à substituição do BCG

Essas vacinas são baseadas no aprimoramento do BCG, através da adição de genes relevantes e têm como objetivo substituir a vacina atual, induzindo melhor resposta protetora do que o BCG, além de uma resposta imune que seja potencializada pelas vacinas-reforço subsequentes. Entre as vacinas estudadas atualmente (Tabela 1), três são BCG recombinantes (rBCG) e estão em fases de testes clínicos: rBCG30, rBCG Δ UreC:Hly e rBCG-AERAS.

A primeira vacina recombinante capaz de induzir grande proteção contra a TB experimental, em comparação ao BCG parental, foi a rBCG30. A cepa Tice de BCG foi recombinada de forma que a mesma expressasse de forma estável e secretasse o Ag85B, uma proteína imunodominante de *M. tuberculosis* (Horwitz, 2005). Animais imunizados com rBCG30 e desafiados com *M. tuberculosis* por via aerossol apresentaram poucos bacilos nos pulmões e baços, demonstrando menor patologia pulmonar, assim como maior sobrevivência do que a vacinação com BCG (Horwitz *et al.*, 2006). Além disso, essas duas cepas de BCG foram comparavelmente avirulentas em cobaias, apresentando um padrão semelhante de crescimento e morte no pulmão, baço e linfonodos regionais (Horwitz & Harth, 2003). Essa cepa recombinante também apresentou replicação limitada em camundongos SCID, sendo mais segura que o BCG, o que também pode se traduzir em uma melhor segurança em indivíduos infectados com o HIV. Ambas as cepas, BCG e rBCG30, foram comparadas em um estudo de fase clínica 1 envolvendo 35 adultos, demonstrando que essas cepas apresentaram semelhante reatogenicidade clínica,

apesar da imunogenicidade ter sido significativamente maior no grupo imunizado com rBCG30 (Hoft *et al.*, 2008).

Outra vacina que também contém modificações no genoma do BCG é a rBCG Δ UreC:Hly (VPM1002), a qual apresentou imunogenicidade maior do que a vacina BCG convencional (Grode *et al.*, 2005). É uma vacina que expressa a listeriolisina (Hly, oriunda de *Listeria monocytogenes*) e é deficiente em Urease C (ureC). A Hly induz a formação de poros na membrana fagossomal permitindo o escape das proteínas deste compartimento para o citosol das APCs, o que favorece a apresentação cruzada, além de aumentar a apoptose das células infectadas do hospedeiro. Essa enzima só é ativa em pH ácido, o qual é neutralizado pelo BCG. Desse modo, a deleção da ureC foi necessária para assegurar o ambiente ácido do fagossoma, permitindo a sua plena atividade biológica (Winau *et al.*, 2005). Recentemente foi descrito que o deslocamento antigênico para o citosol pode favorecer também a estimulação de células Th17, além das células Th1 (Torchinsky *et al.*, 2009). Estudos pré-clínicos em camundongos, cobaias, primatas não-humanos e animais imuno-deficientes indicaram a eficácia dessa construção na proteção, assim como sua capacidade em causar poucos eventos adversos, o que levou à próxima etapa (Grode *et al.*, 2005).

O aprimoramento da vacina anteriormente descrita, rBCG Δ UreC:Hly, levou a obtenção de uma nova vacina denominada rBCG-AERAS-401. Esta modificação foi baseada na substituição da Hly por perfringolisina (pfo), uma citolisina normalmente secretada por *Clostridium perfringens*, com expressão concomitante dos genes dos antígenos Ag85A, Ag85B e TB10.4 clonados num mesmo vetor (Sun *et al.*, 2009). Essa vacina induziu produção de IFN- γ por células T específicas em camundongos, mas falhou em induzir melhor proteção que a cepa parental BCG (Sun *et al.*, 2009).

Tabela 1 – Vacinas micobacterianas candidatas testadas em ensaios clínicos (Tabela adaptada de Kaufmann, 2010; Kaufmann *et al.*, 2010).

	Descrição	Status	Responsáveis
rBCG30	Super-expressão da proteína 30 kDa	Fase 1 finalizada	Universidade da Califórnia / Los Angeles, AERAS
rBCG-δUreC:Hly+ (VPM1002)	Expressão de listeriolisina de <i>Listeria</i>	Fase 1 finalizada	TBVI
rBCG-AERAS-401	Expressão de perfringolisina + Ag85 & TB10.4	Fase 1	AERAS
RUTI	<i>M. tuberculosis</i> desintoxicado em lipossomas	Fase 1 finalizada	Archivel Farma
<i>M. vaccae</i>	<i>M. vaccae</i> inativado	Fase 3 finalizada	NIH

TBVI= Tuberculosis Vaccine Initiative. NIH=National Institute of Health.

1.4.2.2 Vacinas de subunidades como reforço ao BCG

Uma alternativa para potencializar a resposta imune induzida pela vacina BCG seria o uso de outras vacinas como reforço ao BCG, o que tem se comprovado uma excelente estratégia vacinal. Essas vacinas contêm antígenos que, na maioria das vezes, são reconhecidos pelas células T de indivíduos com infecção latente ou daqueles tratados da TB tratados. Assim, dois tipos de vacinas foram desenvolvidas (Tabela 2): (1) proteínas de fusão, compreendendo 2 ou 3 antígenos do BCG ou *M. tuberculosis* (por exemplo, Ag85A, Ag85B, Mtb32, Mtb39, ESAT-6, TB-10.4) ou antígenos micobacterianos nativos purificados (por exemplo, HBHA); e (2) vetores vivos expressando uma ou várias destas proteínas micobacterianas. Estas vacinas, além de reforçar a resposta imune induzida previamente pelo BCG, possibilitam à indução de respostas adicionais aos antígenos específicos de *M. tuberculosis*, requerendo um adjuvante que induza uma resposta Th1.

A vacina H1 constitui-se de uma proteína de fusão, construída a partir dos antígenos Ag85B e ESAT-6. Essa vacina foi desenvolvida associando ao adjuvante IC31, composto de uma mistura de oligodeoxinucleotídeos e aminoácidos policatiônicos (Lingnau *et al.*, 2007). Esta vacina foi avaliada em diversos ensaios clínicos de fase 1 na Holanda e Etiópia, nos quais não induziu efeitos adversos

graves, além de ser altamente imunogênica. Nessa avaliação, a mesma foi capaz de induzir uma forte e persistente resposta Th1 ao Ag85B, entretanto, a modesta resposta das células T ao ESAT-6 não persistiu e nem pareceu interferir nos testes diagnósticos que utilizam ESAT-6, realizado alguns meses após a imunização (Aagaard *et al.*, 2009). Além disso, essa vacina foi capaz de induzir forte resposta imune de memória em indivíduos saudáveis e que apresentaram TB latente, quando administrada em duas doses (van Dissel *et al.*, 2011). No entanto, a fim de reduzir o risco teórico de interferência nos testes diagnósticos baseados na ESAT-6, foi desenvolvida uma vacina alternativa à H1, denominada H4 (AERAS-404), onde a ESAT-6 foi substituída pelo TB-10.4. Após ter mostrado boa proteção em modelos experimentais, essa vacina se encontra na fase 1 de ensaios clínicos (Aagaard *et al.*, 2009).

Duas outras proteínas foram expressas como uma poliproteína recombinante de fusão e incluídas em uma formulação vacinal denominada Mtb72F. As proteínas contidas nesta vacina, Mtb32 e Mtb39, foram identificadas através de respostas de triagem de células T e anticorpos provenientes do sangue de indivíduos infectados, ou seja, na forma latente da TB (Skeiky *et al.*, 1999). Esta proteína de fusão foi formulada com dois diferentes adjuvantes, AS01B e AS02A, constituídos de monofosforil lipídeo A (MPLA) e do composto de superfície-ativa-21 (QS-21), sendo capaz de induzir resposta imune celular, assim como proteção em diferentes modelos experimentais após desafio com *M. tuberculosis* (Skeiky *et al.*, 2004; Reed *et al.* 2009). Do mesmo modo, as fases 1 e inicial da fase 2 de ensaios clínicos já foram concluídas, sendo recentemente apresentados os resultados do primeiro ensaio clínico de fase 1 com Mtb72F/ASO2A (Von Eschen *et al.*, 2009). Esse estudo demonstrou que a vacina foi capaz de induzir boa produção de IL-2 e IFN- γ , assim como células T CD4⁺ ativadas. Além disso, a CMI persistiu por pelo menos seis meses após a vacinação e anticorpos anti-Mtb72F foram detectados em todos os indivíduos (Von Eschen *et al.*, 2009).

Os vetores virais são estratégias atraentes a serem utilizadas em vacinas contra a TB por serem capazes de induzir resposta imune Th1 a um determinado antígeno e em alguns casos, respostas de células T CD8⁺. A primeira vacina contra TB utilizando um vetor viral testada em seres humanos foi a MVA85A, um recombinante construído com vírus vaccínia de replicação deficiente, expressando o

Ag85A. Várias etapas já foram concluídas com esta vacina, mostrando que o MVA85A induz forte resposta Th1 e, em pessoas previamente vacinadas com BCG, mesmo aquelas vacinadas há muitos anos, é capaz de potencializar a imunidade anterior (McShane *et al.*, 2004). Resultados semelhantes foram obtidos em indivíduos infectados com *M. tuberculosis* na sua forma latente (Sander *et al.*, 2009), entretanto alguns dados sugerem que a exposição prévia ao vaccinia pode reduzir a eficácia de vacinas que utilizam o vírus (Rooney *et al.*, 1988). O MVA85A está passando pela fase de múltiplos ensaios clínicos de fase 1 e 2 na África, incluindo ensaios em pacientes infectados com HIV, assim como na Cidade do Cabo teve início recentemente (Julho 2009) a fase 2b em crianças (Sander *et al.*, 2009).

Uma segunda vacina carregada por um vetor viral é a AERAS-402 Ad35, um adenovírus-35 recombinante (gene E1 deletado) deficiente de replicação expressando Ag85A, Ag85B e TB-10.4, como uma única poliproteína (Radosevic *et al.*, 2007). Além dos antígenos estarem expressos no BCG, esta vacina é muito interessante por sua capacidade de induzir resposta de células T CD8⁺. O primeiro ensaio clínico utilizando essa vacina teve início em 2007 e atualmente está em diversos ensaios clínicos de fases 1 e 2b nos Estados Unidos, Europa e África. Um estudo recente relata que a AERAS-402 induz células T CD4⁺ e CD8⁺ robustas e polifuncionais em adultos, podendo ser uma candidata muito promissora (Abel *et al.*, 2010).

Tabela 2 - Vacinas de subunidades e vetorizadas candidatas (Tabela adaptada de Kaufmann, 2010; Kaufmann *et al.*, 2010).

	Perfil	Adjuvante	Status	Responsáveis
Ag85B-ESAT6 (H1-IC31)	Proteínas de fusão	IC31	Fase 1 finalizada	TBVI
Ag85B-ESAT6 (H1-CAF01)	Proteínas de fusão	CAF01	Fase 1	SSI e TBVI
Ag85B-TB10.4 (AERAS-404 / H4)	Proteínas de fusão	IC31	Fase 1 finalizada	Sanofi-Pasteur & AERAS
M72	Proteínas de fusão (34 e 39 kDa)	AS01	Fase 2 finalizada	GSK, AERAS e TBVI
MVA85A (AERAS-485)	Antígenos vetorizados (vaccínia modificada MVA)	Nenhum	Fase 2b (crianças)	AERAS, WT e TBVI
Adeno35-Ag85A-B-TB10.4 (AERAS-402)	Antígenos vetorizados (Adenovírus 35)	Nenhum	Fase 2	AERAS

MVA=modified vaccinia Ankara. Ag=antigen. Ad=adenovirus. AS=adjuvant system. ESAT-6=early secretory antigenic target 6. CAF=cationic adjuvant formulation. Hly=haemolysin. TBVI= Tuberculosis Vaccine Initiative. SSI= Statens Serum Institut. GSK= GlaxoSmithKline.

1.4.2.3 Vacinas Terapêuticas

Vacinas que podem acelerar ou complementar os efeitos da quimioterapia contra a TB fazem parte de uma estratégia interessante a ser testada. Entretanto, um cuidado especial no desenvolvimento de vacinas terapêuticas é com relação ao fenômeno de Koch (exacerbação da doença) (Rook & Stanford, 1996; Cardona, 2007). Assim, duas abordagens diferentes estão sendo testadas em ensaios clínicos (Tabela 1): uma baseada em *Mycobacterium vaccae* morto e a outra usando antígenos micobacterianos selecionados em uma formulação denominada RUTI.

Mycobacterium vaccae, um saprófita ambiental, tem sido utilizado na sua forma inativada como agente imunoterápico para TB. Estudos clínicos mostram que essa vacina pode melhorar os resultados clínicos e radiológicos, assim como diminuir o tempo de cultura negativa de escarro e melhorar a taxa de cura em alguns pacientes com cultura positiva de escarro (incluindo os pacientes tuberculosos resistentes a multidrogas) (Dlugovitzky *et al.*, 2006). No entanto, três grandes ensaios realizados na África, apresentaram resultados discrepantes. O primeiro, na África do Sul, mostrou nenhum efeito relacionado a *M. vaccae*. O segundo, na Uganda, confirmou as observações prévias da conversão do escarro e melhor

apuramento radiológico. Já o terceiro, realizado no Zâmbia e Malawi, mostrou uma tendência de benefícios no tratamento de pacientes HIV-soronegativos, porém não conseguiu demonstrar efeitos benéficos em pacientes soropositivos para o HIV (Stanford *et al.*, 2004). O ensaio de fase 3 realizado na Tanzânia “DarDar”, um estudo duplo-cego, randomizado e controlado com placebo, em pacientes infectados com HIV vacinados com BCG, mostrou que essa vacina reduz o número de casos de TB, no entanto, nesta fase, os dados publicados disponíveis não permitem quaisquer conclusões definitivas sobre a potencial utilidade dessa abordagem (Von Reyn *et al.*, 2010).

RUTI é uma vacina desenvolvida através do crescimento de *M. tuberculosis* que, sob condições de estresse, é então fragmentado, desintoxicado e formulado em lipossomas (Cardona, 2006). Seu efeito terapêutico pode estar relacionado à indução de resposta imune Th1 e à estimulação de imunidade específica contra antígenos estruturais e relacionados ao crescimento (Gil *et al.*, 2008). Já a imunoterapia com RUTI seguida da quimioterapia é indicada para impedir a reativação de bacilos latentes nos tecidos, onde a imunidade específica local pode ser suprimida. Dessa forma, camundongos e cobaias tratados com RUTI e infectados por *M. tuberculosis* mostraram baixa carga bacilar, menor infiltração pulmonar e forte resposta imune, quando comparados ao controle BCG (Guirado *et al.*, 2006). Atualmente, essa vacina teve a fase 1 de ensaios clínicos finalizada, demonstrando que 5 doses dessa vacina foi capaz de induzir forte resposta de células T-PPD específicas, no sangue total de indivíduos saudáveis (Vilaplana *et al.*, 2010).

1.4.3 Vacinas de DNA (vacinas gênicas)

Vacinas gênicas são constituídas por DNAs plasmidiais, nos quais genes ou fragmentos de genes que codificam antígenos potencialmente imunizantes são carregados. Além das grandes vantagens apresentadas por essas vacinas, foi demonstrado em uma revisão da literatura sobre novas vacinas contra TB que a vacina gênica é uma das abordagens mais comumente testada em estudos de proteção utilizando desafios com microrganismos virulentos em modelos animais

(Sarhan, 2010). Além disso, a imunização com formulações vacinais expressando parte do gene de 2 ou mais antígenos de *M. tuberculosis*, caracterizados como proteínas de fusão, apresentaram melhores níveis de proteção em relação às vacinas de DNA monovalentes (Sali *et al.*, 2008).

O processo de vacinação com DNA consiste na inoculação intramuscular do mesmo sendo que a mensagem para a síntese do antígeno estudado é levada ao interior das células do indivíduo vacinado. Assim, após a inoculação intramuscular, o DNA é incorporado às células musculares (miócitos) e/ou APC's. Os DNAs que forem endocitados pelas células no sítio de inoculação permanecem no núcleo celular sem ocorrer incorporação ao genoma da célula hospedeira (Ledwith *et al.*, 2000). As vias metabólicas da célula hospedeira são utilizadas para os processos de transcrição do DNA inoculado e, em seguida, o RNA mensageiro é traduzido ocorrendo a síntese do antígeno proteico relacionado ao agente infeccioso. Os antígenos expressos endogenamente são processados pelas APCs e os fragmentos resultantes são complexados com moléculas de classe I que são codificadas por genes do MHC de classe I. Em seguida, estes peptídeos são apresentados na superfície celular para o reconhecimento e ativação específica de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos. Alguns dos antígenos produzidos pelas células musculares são secretados para o espaço extracelular, onde podem tanto estimular linfócitos B a produzirem anticorpos específicos como serem endocitados por outras APC's. No processo de endocitose os antígenos passam do compartimento extracelular para o interior das células APC e, por este motivo, são considerados antígenos exógenos e assim processados em compartimentos celulares diferentes daqueles realizados quando o antígeno é originado dentro da célula. Os fragmentos de antígenos exógenos são complexados com moléculas da classe II e apresentados na superfície das células apresentadoras para o reconhecimento e ativação de linfócitos T CD4⁺ auxiliares (Henke, 2002).

Vacinas de DNA que codificam genes de antígenos micobacterianos, tais como membros do complexo Ag85 da família da micolil-transferase (Ulmer *et al.*, 1997; Kamath *et al.*, 1999), ESAT-6 (Brandt *et al.*, 2000), o Pst-3 da família da proteína ligadora de fosfato (Tanghe *et al.*, 1999), proteínas de choque térmico 60, 65, 70 (Johansen *et al.*, 2003; Tebianian *et al.*, 2011) e APA (Garapin *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2003; Ferraz *et al.*, 2004; Sable *et al.*, 2011) têm sido frequentemente

testadas e sua eficácia contra TB avaliada em modelos experimentais. Da mesma forma, interleucinas também têm sido inseridas em conjunto com essas proteínas devido sua capacidade de aumentar a imunogenicidade destas vacinas, assim como, por exemplo, vacinas de DNA codificando Ag85B com IL-21 (Dou *et al.*, 2008) e HSP65 e IL-2 (Wang *et al.*, 2008), capazes de induzir forte resposta imune celular.

Apesar de alguns achados experimentais iniciais não terem sido animadores (Taylor *et al.*, 2003), as vacinas gênicas têm geralmente sido evidenciadas como vacinas seguras em estudos pré-clínicos e clínicos (Schalk *et al.*, 2006). Em resposta a essas vacinas, não foram encontrados até então qualquer sinal de autoimunidade, desenvolvimento de anticorpos anti-nucleares ou específicos à dupla-fita de DNA ou, até mesmo, integrações do DNA plasmidial nos cromossomos (Cebere *et al.*, 2006; Coelho-Castelo *et al.*, 2006).

1.4.4 Sistema de liberação eficaz: microesferas poliméricas

Microesferas poliméricas têm surgido como uma estratégia interessante a ser empregada no processo de vacinação. Esses adjuvantes/sistemas de carreamento são caracterizados pela sua baixa toxicidade, uma vez que são constituídos de polímeros de ácidos lático e glicólico (PLGA). Possuem um potencial para atuarem como mediadores de transfecção de DNA direcionada a células fagocíticas, como os macrófagos, e na sua proteção contra degradação biológica pelas nucleases (Wang *et al.*, 1999; Jiang, 2005). Além disso, a eficácia das vacinas de DNA aumenta se o material genético for revestido por estes polímeros, os quais o protegem e o liberam de forma gradual nas células do organismo vacinado. Dessa forma, duas formulações distintas, baseadas nesses polímeros ou em lipídios catiônicos, foram relatadas, mostrando-se efetivas para a liberação da vacina de DNA para o HIV no modelo primatas não-humano (Otten *et al.*, 2005), assim como quando utilizado contra antrax em coelhos (Hermanson *et al.*, 2004).

PLGA é um material biocompatível e biodegradável com relatos de uso seguro na medicina, não apresentando manifestações ulcerativas no sítio de administração se utilizado por via parenteral (Wang *et al.*, 1999). Suas partículas, menores que 10 µm de diâmetro, são ativamente recolhidas por células como os

macrófagos (Eldridge *et al.*, 1991). No organismo, estes polímeros são hidrolisados e, uma vez degradados, liberam os ácidos lático e glicólico, substratos inócuos ao organismo (Lima *et al.*, 2003).

Na avaliação da eficácia do microencapsulamento do DNA, foi verificado que o encapsulamento do DNA-hsp65 em microesferas de PLGA não interferiu na sua funcionalidade. Assim, quando administrado em camundongos BALB/c, microesferas contendo DNA-hsp65 foram capazes de induzir resposta imune específica, levando à redução de 10 vezes na quantidade de DNA utilizada quando comparado à injeção intramuscular do DNA-hsp65 nu (Lima *et al.*, 2003). Da mesma forma, estudos de vacinas de DNA inoculadas diretamente no pulmão dos animais têm sido muito promissores. Em um recente trabalho utilizando o Ag85B encapsulado em microesferas de PLGA, administrado sob pulverização diretamente no pulmão de cobaias, foi demonstrado a eficácia dessa formulação em potencializar a imunização previamente induzida pelo BCG, após infecção por *M. tuberculosis*. Neste estudo foram observadas diferenças na localização, número e tamanho dos granulomas, em comparação à vacina BCG (Lu *et al.*, 2010).

1.4.5 Adjuvante DMT: um grande imunomodulador

Os adjuvantes, em sua maioria, são moléculas derivadas de patógenos que possuem a vantagem de potencializar a imunogenicidade de antígenos administrados como vacinas (Ulmer *et al.*, 2006), como por exemplo, o 6,6'-dimicolato de trealose (DMT), que ativa células do sistema imune inato. Uma vez ativadas, essas células modulam e são capazes de direcionar para a resposta imune adquirida ou adaptativa (Lima *et al.*, 2004). A resposta imune específica em camundongos imunizados com DMT é constituída de resposta celular em consequência da ativação de macrófagos e produção de citocinas Th1 (Lima *et al.*, 2001; Mitsuyama *et al.*, 2003).

O DMT é um potente imunomodulador que está localizado na camada externa da parede celular das micobactérias (Noll, 1956). Este adjuvante possui propriedades imunoestimulatórias, apresenta capacidade de aumentar resistência

não-específica a tumores e a infecções bacterianas e pode ser responsável por inibir a fusão fagossoma-lisossoma, em modelo murino (Lima *et al.*, 2001).

O efeito adjuvante do DMT purificado na resposta imune foi estudado e observou-se que a associação desse adjuvante com a vacina recombinante contra hepatite B potencializou tanto a produção de anticorpos quanto a resposta imune celular contra o antígeno. Além disso, a administração intratraqueal de DMT encapsulado com microesferas induziu altos níveis de citocinas no pulmão de camundongos e também altos níveis de óxido nítrico (NO), potente agente microbicida, em células do lavado broncoalveolar destes animais (Saito *et al.*, 1976; Koike *et al.*, 1998; Lima *et al.*, 2003). Em um trabalho mais recente foi demonstrado que o DMT associado a um segundo adjuvante, juntamente com a proteína de fusão Ag85B-ESAT-6, foi capaz de induzir índices mais altos de IgG2b/IgG1 e na produção e IFN- γ , quando comparado à imunização utilizando somente a proteína (Xu *et al.*, 2006).

1.4.6 Imunização heteróloga: uma imunização promissora

A imunização heteróloga (*prime-boost*) envolve a administração de duas vacinas diferentes inoculadas em intervalo de tempos diferentes. O primeiro estudo realizado usando esta estratégia utilizou uma vacina gênica administrada como primeira dose, seguido da administração do MVA como reforço, ambos expressando antígenos de *Plasmodium berghei*, conferindo proteção contra malária (Schneider *et al.*, 1998). Posteriormente, essa estratégia foi explorada para o desenvolvimento de vacinas contra outras patologias, como a AIDS (Hanke *et al.*, 1999) e a TB (Mcshane *et al.*, 2005). Alguns estudos demonstram que a resposta imune celular pode ser significativamente reforçada pela combinação de diferentes vacinas (diferentes antígenos) através da imunização heteróloga. Uma vez que a imunização homóloga geralmente só aumenta o nível da resposta imune a um número limitado de epítomos imunodominantes, combinações heterólogas podem melhorar não só a magnitude da resposta, mas também ampliar o número de epítomos, potencializando a funcionalidade das células T e dos anticorpos (McShane & Hill, 2005; Seder *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008). O reforço da imunização inicial com a vacina de DNA

codificando o Ag85A de *M. tuberculosis* com a proteína recombinante (rAg85A) induziu proteção significativa contra a TB em relação a imunização somente com a vacina DNA-Ag85A (Tanghe *et al.*, 2008). Entretanto, nem todos os estudos que utilizam este tipo de imunização induziram proteção. Por exemplo, quando se utilizou um vetor *Bordetella pertussis* (CyaA) expressando Ag85A ou ESAT-6 foi mostrado aumento significativo da produção de IFN- γ e IL-12, todavia essa vacina não foi protetora contra a TB (Majlessi *et al.*, 2006).

Contudo, estudos pré-clínicos utilizando essa abordagem vêm demonstrando bons resultados de proteção nos modelos murino, bovino (Skinner *et al.*, 2005; Vordermeier *et al.*, 2009) e primatas não-humanos (Verreck *et al.*, 2009). Tang e colaboradores demonstraram que a inoculação da vacina gênica codificando a associação do Ag85A com o fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) foi capaz de induzir resposta celular assim como humoral, quando comparado aos animais vacinados somente com o DNA nu, quando utilizada como reforço ao BCG (Tang *et al.*, 2007). Do mesmo modo, um estudo recente demonstrou que camundongos recém-natos vacinados com BCG e posteriormente com a proteína hemaglutinina heparina (HBHA) obtiveram maior imunidade protetora contra *M. tuberculosis*, quando desafiados tanto pela via intranasal quanto via aerossol. Nesse estudo foi evidenciada uma redução considerável da carga micobacteriana no baço e pulmão dos animais, o que poderia estar associado à geração de células de memória efetoras Th1 no pulmão, além da produção de IFN- γ , IL-12 e TGF- β (Guerrero *et al.*, 2010).

Outro estudo utilizando a vacina MVA85A após a primeira imunização com o BCG mostrou que essa imunização foi capaz de induzir proteção contra a TB em camundongos e níveis significativos de células T CD4⁺ e CD8⁺ antígeno-específicas, em relação aos animais somente imunizados com MVA85A (Goonetilleke *et al.*, 2003). No modelo cobaia, animais mais sensíveis a TB em relação aos camundongos, os autores verificaram que a vacina com o vírus da varíola recombinante expressando o Ag85A (PF85A) após vacina a recombinante BCG-MVA85 também induziu proteção significativa frente desafio com *M. tuberculosis* (Williams *et al.*, 2005). Desse modo, o sucesso da imunização heteróloga utilizando o BCG seguido da imunização com MVA85A possibilitou o início da fase 1 de

ensaios clínicos. Assim, desde 2005 essa estratégia vem sendo testada, devido a sua capacidade em induzir maiores níveis de imunidade celular do que a imunização homóloga (McShane *et al.*, 2005). Fletcher e colaboradores mostraram que a imunização heteróloga foi capaz de regular a citocina TGF- β , essencial na geração de células T reguladoras FoxP3⁺, as quais são capazes de inibir a indução da resposta imune protetora (Fletcher *et al.*, 2008). Os resultados também mostraram que é uma estratégia segura uma vez que não induziu efeitos colaterais em crianças e em adolescentes saudáveis, previamente imunizadas com BCG ao nascimento (Scriba *et al.*, 2010).

1.4.7 O antígeno APA (*Alanine Proline Antigen*)

Diversos estudos demonstraram que os antígenos presentes no FC de micobactérias patogênicas são indutores de imunidade protetora contra um desafio por *M. tuberculosis* em camundongos (Andersen, 1994; Roberts *et al.*, 1995; Garapin *et al.*, 2003; Tchilian *et al.*, 2009), cobaias (Pal & Horwitz, 1992; Horwitz *et al.*, 1995; Jain *et al.*, 2008) e primatas não-humanos (Verreck *et al.*, 2009).

Entre aqueles já caracterizados, em modelos animais, figura o antígeno APA, um complexo antigênico de 45-47 kDa, que foi inicialmente isolado a partir do FC de *M. bovis* BCG, principalmente por sua capacidade de induzir tanto imunidade celular quanto humoral (Romain *et al.*, 1993). Dois estudos subsequentes avaliaram a resposta imune celular induzida por estas moléculas e verificaram que as mesmas induzem resposta linfoproliferativa de mesma intensidade que o PPD, e reação de hipersensibilidade do tipo tardio (DTH) 3 vezes mais intensa que esse antígeno, quando testadas em cobaias imunizadas com BCG vivo (Horn *et al.*, 1999; Romain *et al.*, 1999). A especificidade e sensibilidade do antígeno foram também avaliadas entre pacientes com TB pulmonar e extrapulmonar e foi verificado que essa proteína está entre os principais antígenos reconhecidos pelos soros de pacientes portadores de TB pulmonar. Dessa forma, foi testada a reatividade imunológica induzida pela APA, em indivíduos saudáveis PPD positivos e indivíduos com TB infectados ou não pelo HIV, tendo o teste utilizado mostrado grande especificidade de 98% (Diabouga *et al.*, 1997). Do mesmo modo o antígeno APA foi capaz de induzir resposta imune

celular em pacientes com TB pulmonar ativa e indivíduos contactantes, sendo que nenhum dos indivíduos saudáveis testados respondeu a este antígeno. Estes resultados sugerem que o antígeno APA é capaz de diferenciar indivíduos com exposição frequente a *M. tuberculosis* daqueles não expostos, podendo ser utilizado como marcador de infecção/doença pelo *M. tuberculosis* (Horn *et al.*, 2002).

A análise química destas moléculas mostrou que elas são glicosiladas (Dobos *et al.*, 1996; Horn *et al.*, 1999), e quando demanosiladas apresentaram uma perda importante da sua atividade biológica, revelada pela reação DTH *in vivo* e pela resposta linfoproliferativa *in vitro*. Esses estudos mostram a importância da glicosilação na atividade biológica desta proteína (Romain *et al.*, 1999; Horn *et al.*, 1999).

O mesmo grupo mostrou que o DNA-nú da APA, inoculado por via intramuscular em camundongos e cobaias, induziu intensa resposta Th1 e Th2. Apesar da glicosilação micobacteriana ser necessária para provocar uma importante reação de DTH em cobaias, plasmídeos contendo *apa* foram capazes de causar uma intensa reação DTH. Neste mesmo estudo, foi mostrado que a imunização com DNA da APA induziu efeito protetor significativo frente infecção por *M. tuberculosis* em camundongos (Garapin *et al.*, 2001).

Em estudo posterior realizado em cobaias, animais altamente susceptíveis à infecção micobacteriana, foi mostrado que o antígeno APA induziu proteção após desafio com *M. tuberculosis* sugerindo que a atividade de células T antígeno-específicas pode ser um componente importante da resposta imune protetora à infecção com micobactéria (Kumar *et al.*, 2003). Além disso, Ferraz e colaboradores mostraram que uma construção vacinal codificando os genes dos antígenos micobacterianos APA, Hsp65 e Hsp70, após uma imunização com BCG, resultou numa significativa redução de micobactérias no pulmão dos animais imunizados, após desafio por *M. tuberculosis* (Ferraz *et al.*, 2004). Esta construção testada no contexto de uma imunização heteróloga com BCG se mostrou eficaz na proteção contra a tuberculose bovina (Skinner *et al.*, 2003). Bem recentemente, Sable *et al.* (2011) demonstraram que uma única dose por via intranasal de uma vacina composta por nove proteínas de *M. tuberculosis*, entre essas a APA, inoculada em um contexto de uma imunização heteróloga após vacinação com BCG, induziu resposta antígena-

específica de células T mais forte e prolongada no parênquima pulmonar e em nódulos linfáticos cervicais de camundongos BALB/c, quando comparada à imunização por via subcutânea.

Nossos resultados de imunogenicidade utilizando a formulação vacinal pVAX_{apa}-DMT-Me, quando administrada pela estratégia de imunização heteróloga, mostraram que essa imunização estimulou a produção tanto de IgG2a quanto de IgG1 específicos ao FC, além de níveis elevados de IFN- γ e baixos de IL-4 no sobrenadante de cultura de esplenócitos estimulados com FC, indicando a indução de resposta imune Th1. Do mesmo modo, foi constatado aumento na frequência de células T CD4⁺ efectoras de memória (CD4⁺CD44^{high}CD62L^{low}) no baço dos animais imunizados com esta estratégia em comparação à vacina atual BCG, 30 dias após a última imunização. Portanto, nossos resultados mostraram que a imunização inicial com BCG por via subcutânea seguida da imunização por via intramuscular com a vacina pVAX_{apa} (BCG/pVAX_{apa}-DMT-Me) foi mais imunogênica do que as imunizações com vetor e com BCG, incluindo essa vacina como mais uma candidata à profilaxia da TB (Carlétti *et al.*, 2008), nos permitindo assim passar para os ensaios de proteção.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da vacina gênica pVAX_{apa}-DMT-Me utilizando a estratégia de imunização heteróloga, na indução da sua eficácia protetora após infecção por *M. tuberculosis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a eficácia protetora dos esquemas de imunização após infecção por *M. tuberculosis*, através da:
 - a. determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC) no pulmão dos animais desafiados, imunizados ou não;
 - b. análise histopatológica do pulmão dos animais desafiados, imunizados ou não.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos “SPF” (*Specific Pathogen Free*) fêmeas, da linhagem BALB/c, com idade entre 6 e 8 semanas, e peso entre 16 e 26 g, obtidos do biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP - USP. Todos os animais foram mantidos sob condições específicas livres de patógenos em Laboratório de nível de Biossegurança III, adequado para a manipulação de animais infectados com *M. tuberculosis*, com livre acesso à água e ração autoclavados, seguindo as normas da Comissão Técnica Nacional de Biosegurança (CNTBio).

3.2 BACTÉRIAS

A preparação do inóculo de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) foi realizada a partir de uma alíquota de micobactérias congelada à -70 °C (com viabilidade superior a 85%). Foram distribuídos 200 µL dessa alíquota em 10 mL de meio de cultura Middlebrook 7H9 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) enriquecido com Middlebrook ADC™ (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), seguindo-se incubação por 10 dias a 37 °C. A suspensão de micobactérias obtida foi centrifugada a 3500 rpm por 20 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 2 mL de tampão fosfato/salina (PBS) estéril (livre de endotoxinas) e agitado vigorosamente por 2 a 3 minutos em tubo contendo pérolas de vidro, até adquirir aspecto homogêneo. A viabilidade da cultura foi verificada incubando-se 100 µL dessa suspensão de bactérias com 100 µL de diacetato de fluoresceína (2 µg/mL – Acros Organics, Geel, Bélgica) e 100 µL de brometo de etídio (10 mg/mL – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 10 minutos a 37 °C. A viabilidade foi determinada com auxílio de microscópio de fluorescência modelo Aristoplan (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). As bactérias viáveis apresentavam coloração verde enquanto as bactérias mortas coravam-se com a solução de brometo e apresentavam uma coloração avermelhada. As suspensões com viabilidade superior a 85% foram submetidas à quantificação utilizando a escala de Mc Farland para se obter uma concentração de 1×10^6 bacilos/mL, para utilização de 100 µL contendo

1×10^5 bacilos nas infecções. Todos os procedimentos de cultura de micobactéria, preparo do inóculo e desafio dos animais foram realizados em laboratório de nível de biossegurança III.

A vacina BCG *Moreau* foi doada pela Fundação Ataulpho de Paiva (Rio de Janeiro, Brasil) e utilizada de acordo com as instruções do fabricante. Após limpeza do local da abertura da ampola com álcool, a mesma foi quebrada lentamente no ponto de ruptura, permitindo que o ar penetrasse gradualmente. Com uma seringa descartável, o pó vacinal foi reconstituído com 1 mL de salina apirogênica, agitando-se lentamente a ampola até obtenção de uma suspensão homogênea. Essa suspensão foi utilizada nos procedimentos de imunização.

3.3 OBTENÇÃO E ENCAPSULAMENTO DOS PLASMÍDEOS DE DNA

A vacina de DNA pVAXapa é caracterizada pela presença de um inserto de 875 pares de bases (pb) que codifica para a proteína APA de *M. tuberculosis*, subclonado no sítios *EcoRI* e *XhoI* (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) do vetor pVAX1 (Invitrogen®, Gaithersburg, MD, USA). As construções plasmidiais foram confeccionadas no Instituto Butantan/Fiocruz. Meio líquido LB (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) contendo ampicilina (100 µg/mL) foi utilizado na cultura de DH5α *Escherichia coli*, transformada com o plasmídeo pVAX1 e também com plasmídeo contendo *apa* (pVAXapa). O gene *apa*, sem a sequência sinal, foi clonado a partir do plasmídeo pAG831 (Garapin *et al.*, 2001) por PCR utilizando os seguintes primers: F 5' TAG GAATCC ACC ATG GAT CCG GAG CCA GCG CC 3' e R 5' TAG CTCGAG TCA GGC CGG TAA GGT CCG 3'. Os fragmentos foram clonados no pGEM-T Easy (Promega Corp., Madison, WI, USA) e posteriormente em pVAX1 utilizando *EcoRI* e *XhoI*. A sequência do consenso de Kozak (em itálico> de mRNAs de vertebrados foi aderida anteriormente ao códon de iniciação ATG. A sequência de DNA foi realizada com o sequenciador de DNA ABI Prism (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os plasmídeos foram purificados utilizando Endofree Plasmid Giga Kit (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA, USA). Além disso, foi realizado o teste de detecção de endotoxinas utilizando Limulus Amebocyte Lysate

kit – QCL-1000 (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA), sendo mostrado atividade de endotoxina em todas as formulações de microesferas menor que 0,01 EU/ μ g.

3.4 PREPARAÇÃO DAS MICROESFERAS

As microesferas foram obtidas pela técnica da dupla emulsão e evaporação do solvente no Laboratório do Núcleo de Pesquisa em Tuberculose - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP - USP. De forma resumida, 30 mL da solução de diclorometano contendo 400 mg do polímero de PLGA 50:50 (Resomerfrom Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Alemanha) e 0,5 mg de DMT (Sigma, St Louis, EUA) foi emulsificado com 0,3 mL da fase dispersa contendo 5 mg de DNA (pVAXapa ou pVAX), utilizando o homogeneizador T25 Ultraturrax (IKA - Labortechnik, Alemanha) para produção primária de emulsão do tipo água-óleo. Esta emulsão foi então misturada com 100 ml da fase contínua contendo álcool vinílico 1-3% de poli (Mowiol 40-88, Aldrich Chemicals, Wankee, WI, EUA) como surfactante, formando uma emulsão estável. A mistura foi agitada por 6 h no homogeneizador IKA RW20 para evaporação do solvente. As microesferas foram coletadas e lavadas três vezes com água estéril, liofilizadas e armazenadas a 4 °C.

3.5 IMUNIZAÇÃO, GRUPOS EXPERIMENTAIS E INFECÇÃO

Foram utilizados os seguintes esquemas de imunização abaixo (Tabela 1):

a) Imunização com BCG: A vacina BCG *Moreau* foi administrada por via subcutânea, em uma única dose (5×10^5 bacilos) e os animais foram infectados trinta dias após. Trinta e setenta dias após a infecção, os animais foram sacrificados para avaliação da resposta imune.

b) Imunização pela estratégia *Prime (BCG) – Boost (DNA)*: A vacina BCG *Moreau* foi administrada por via subcutânea, em uma dose (5×10^5 bacilos). Trinta dias após os animais receberam uma dose (5 mg de microesferas ou lipossomas / 30 μ g de DNA / 6,25 μ g de DMT) da formulação pVAXapa-DMT-Me (BCG-APA) e seu respectivo controle (pVAX-DMT-Me – BCG-PVAX) por via intramuscular (im), sendo

infectados trinta dias após. Trinta e setenta dias após a infecção, os animais foram sacrificados para avaliação da resposta imune.

c) Grupos Controle: Os animais dos grupos controle foram inoculados com 1×10^5 UFC de *M. tuberculosis* ou só receberam salina apirogênica.

e) Infecção dos animais com *M. tuberculosis* (cepa H37Rv): Cada animal foi infectado com 100 μ L de suspensão contendo 1×10^5 bacilos por via intratraqueal, 30 dias após a administração da dose de reforço. Para esse procedimento, os animais foram previamente anestesiados com uma solução de cloridrato de quetamina 50% - xilazina 2% em PBS por via intraperitoneal. Após a anestesia, se realizou o procedimento cirúrgico para exposição da traqueia e inoculação da suspensão contendo os bacilos. Como controle experimental, foi acrescentado um grupo de animais que recebeu somente PBS por via intratraqueal em vez do desafio com a micobactéria.

Tabela 3 - Desenho Experimental e Construções vacinais (n=20).

Grupos	Prime (dia 0) ^a	Boost (dia 30)	Infecção (dia 60) ^b	Dia 90	Dia 130
PBS	salina	salina ^d	salina		
TB	salina	salina ^d		Eutanásia	Eutanásia
BCG	BCG ^c	salina ^d	Desafio H37Rv	Eutanásia	Eutanásia
BCG/PVAX	BCG ^c	pVAX+DMT-Me ^{d,e}			
BCG/APA	BCG ^c	pVAX _{apa} -DMT-Me ^{d,e}			

^aVia subcutânea; ^bVia intratraqueal; ^c 5×10^5 bactérias em 100 μ L; ^dVia intramuscular; ^e100 μ g em 100 μ L Salina.

3.6 COLETA DOS ÓRGÃOS

3.6.1 Baço

Ao término do protocolo de infecção, os animais foram eutanasiados para remoção do baço. Após a retirada dos mesmos, através de procedimento cirúrgico, os órgãos foram colocados em placas de Petri estéreis contendo 2 mL de meio RPMI-1640 incompleto (Gibco BRL) e divulgados com auxílio de pinça

anatômica estéril, retirando-se uma alíquota para ser utilizada nos ensaios de proteção (UFC).

3.6.2 Pulmão

Os pulmões foram coletados e colocados em placas de Petri estéreis contendo 2 mL de meio RPMI-1640 incompleto (Gibco BRL). Foram pesados e seus lóbulos separados para os diversos procedimentos experimentais como descrito na tabela 2:

Tabela 4 - Divisão dos lóbulos pulmonares nos procedimentos experimentais.

Procedimentos	Lóbulos dos pulmões
Histopatologia	Superior direito
Ensaio UFC	Médio e inferior direitos

Os lóbulos médio e inferior direitos, destinados aos ensaios de UFC, foram pesados, cortados em pequenos fragmentos e transferidos para um tubo cônico (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) de 50 mL contendo 15 mL da solução de digestão. Essa solução foi preparada em meio RPMI-incompleto contendo 0,5 µg/mL de liberase (Roche, Indianápolis, IN, USA) e 25 U/mL de desoxiribonuclease I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Em seguida, os tubos foram incubados a 37°C, sob agitação constante, durante 30 minutos. Após a digestão, as células foram dispersas com auxílio de uma seringa de 10 mL e centrifugadas por 10 minutos a 453 x g a 4 °C. O sedimento foi ressuspenso em 1 mL de RPMI-1640 complementado com 10% de SBF (Soro Bovino Fetal – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para inibir atividade da enzima liberase. Uma alíquota de 100 µL dessa suspensão foi retirada para o protocolo de UFC.

3.7 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFC)

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

3.8 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO PULMÃO

Para a análise histopatológica dos pulmões dos animais, o lóbulo superior direito do pulmão de animais dos diferentes grupos experimentais foi coletado e fixado em formol tamponado com fosfato. Após o processamento dos tecidos, sendo realizado no Serviço de Patologia do IPEC-Fiocruz, cortes histológicos de 3-5 μm de espessura foram dispostos em lâminas e corados com Hematoxilina & Eosina (H&E). Os pulmões foram avaliados quanto ao recrutamento e a caracterização do infiltrado celular.

As lâminas contendo os pulmões dos camundongos foram examinadas em um estudo cego por uma patologista especializada em doenças pulmonares, estabelecendo o padrão e extensão das alterações histológicas. A classificação foi baseada nas áreas teciduais mais inflamadas de cada corte histológico, sendo definidas como: intensa (4+), intermediária (3+), baixa (2+) e muito baixa (1+). A ausência de resposta foi designada por um sinal de menos (-).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada pela avaliação da variância (ANOVA) e, o teste de Tukey foi utilizado para averiguar diferenças entre o grupo experimental e os grupos controle. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão e foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$. Foi utilizado o programa SPSS® Statistics 17.0 (IBM Company, Chicago, USA) para as análises.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA PROTETORA DA VACINA GÊNICA pVAX_{apa}-DMT-Me APÓS INFECÇÃO POR *M. tuberculosis*

Na tentativa de aprimorar a proteção do BCG utilizamos um protocolo de imunização heteróloga com a vacina gênica pVAX_{apa}-DMT-Me e avaliamos a proteção contra *M. tuberculosis* em camundongos, por meio da determinação do número de bacilos no pulmão e baço dos animais ao longo da infecção. Assim, camundongos BALB/c foram imunizados ou com uma única dose da vacina BCG, ou uma dose de BCG seguido por uma dose de pVAX-Me ou pVAX_{apa}-Me. Como controle do procedimento de infecção, utilizamos camundongos que foram infectados e não imunizados. Trinta e setenta dias após a infecção, os animais foram avaliados através do ensaio de UFC.

Conforme mostrado na Figura 3, os grupos que receberam a vacina BCG como primeira dose (BCG-PVAX e BCG-APA) e também o grupo vacinado apenas com o BCG apresentaram proteção pulmonar significativa, trinta (Fig. 2A) e setenta (Fig. 2B) dias após infecção, correspondendo às fases inicial e crônica da doença, respectivamente, quando comparados ao grupo TB ($P < 0.005$). Entretanto, a melhor proteção foi conferida pela estratégia de imunização heteróloga contendo a formulação pVAX_{apa}-DMT-Me (BCG-APA), setenta dias após infecção (4,6 log). Verificou-se redução de aproximadamente 1,0 log na carga bacteriana entre o mesmo grupo quando comparado aos grupos BCG (5,4 log) e BCG-PVAX (5,3 log), assim como, redução significativa de 2,0 log quando comparado ao grupo TB (6,6 log).

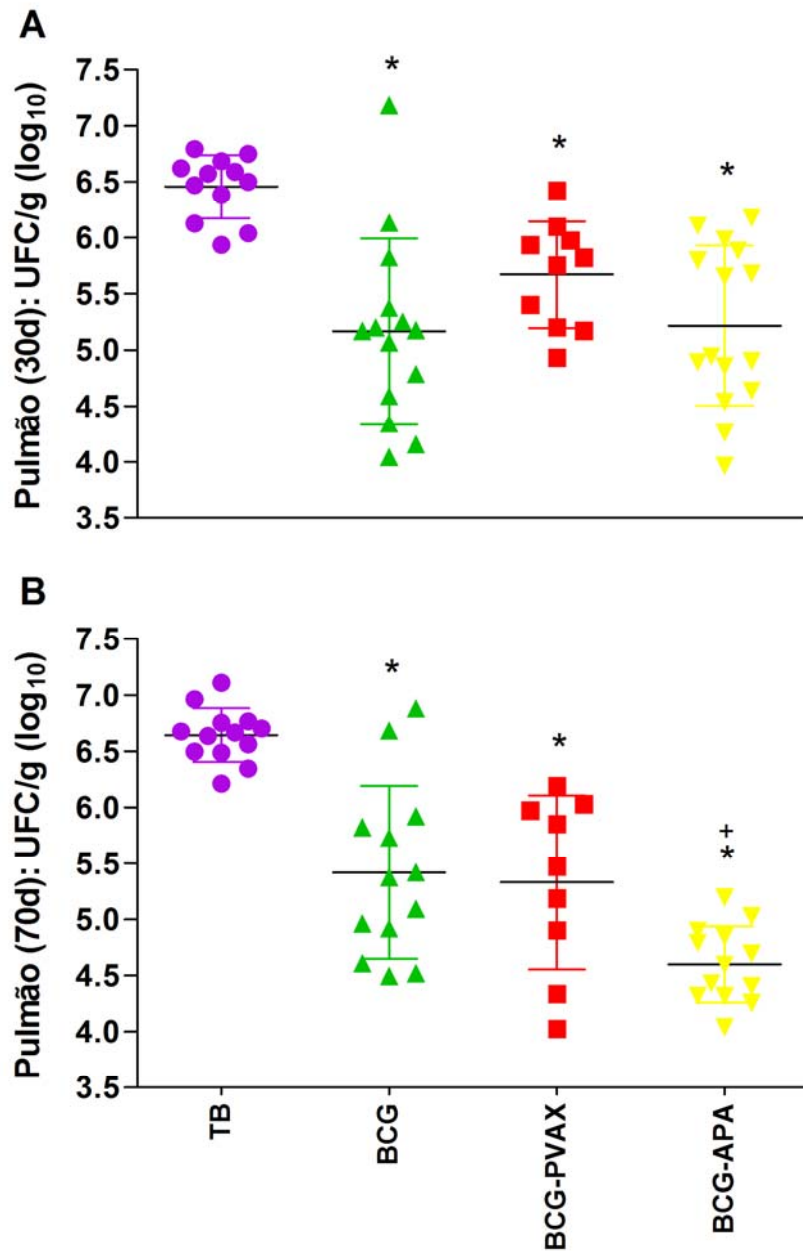


Figura 2 – Avaliação do número de UFC presentes nos pulmões dos animais imunizados por diferentes estratégias vacinais. Camundongos BALB/c (n=20) foram imunizados por via s.c. com uma única dose da vacina BCG (5×10^5 bacilos; grupo BCG); uma dose de BCG, via s.c., seguido por uma dose de pVAX-Me ou pVAX_{apa}-Me, via i.m., 30 dias após (BCG-PVAX; BCG-APA). Trinta dias após vacinação, os animais foram infectados com *M. tuberculosis* H37Rv (1×10^5 bacilos). 30 (A) e 70 (B) dias após infecção, os pulmões foram processados para o ensaio de UFC. Resultados expressos como média \pm desvio padrão da média do número de UFC, expressos em \log_{10} . * $p < 0,05$: animais imunizados versus não-imunizados e infectados (grupo TB); + $p < 0,05$: animais imunizados versus grupo BCG.

Além de avaliarmos a proteção no sítio da infecção, também verificamos se a imunização heteróloga foi eficaz ao controlar o *M. tuberculosis* no baço, uma vez que o bacilo também é encontrado nesse órgão após infecção. Para tal, coletamos o baço dos animais imunizados e infectados. Tanto na fase inicial (Fig. 3A) quanto na fase crônica (Fig. 3B) da infecção experimental, constatamos que todos os grupos de animais imunizados (BCG, BCG-PVAX ou BCG-APA) apresentaram redução de aproximadamente 1 log, sendo essa significativa quando comparados ao grupo dos animais que não foram imunizados, somente infectados (grupo TB: $P < 0,005$).

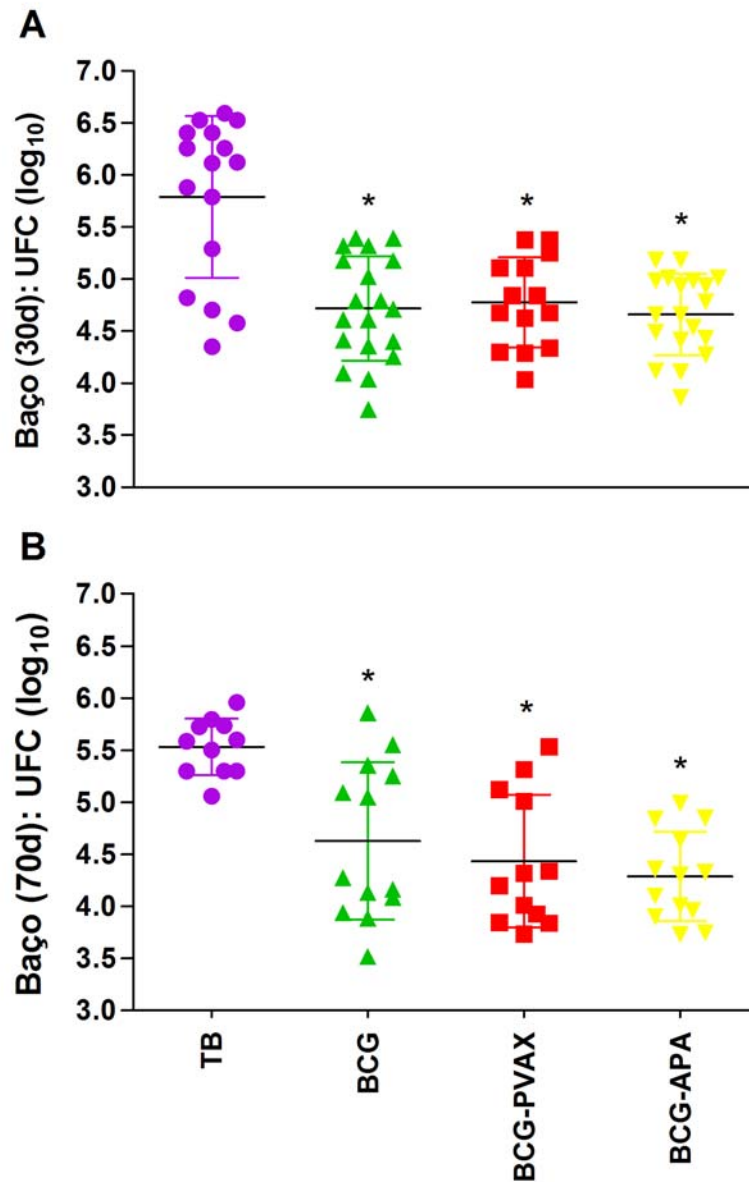


Figura 3 – Proteção esplênica contra TB experimental conferida por diferentes estratégias vacinais. Camundongos BALB/c (n=20) foram imunizados por via s.c. com uma única dose da vacina BCG (5×10^5 bacilos; grupo BCG); uma dose de BCG, via s.c., seguido por uma dose de pVAX-Me ou pVAX_{apa}-Me, via i.m., 30 dias após (BCG-PVAX; BCG-APA). Trinta dias após vacinação, os animais foram infectados com *M. tuberculosis* H37Rv (1×10^5 bacilos). 30 (A) e 70 (B) dias após infecção, os baços foram processados para o ensaio de UFC. Resultados expressos como média \pm desvio padrão da média do número de UFC, expressos em \log_{10} . * $p < 0,05$: animais imunizados versus não-imunizados e infectados (grupo TB).

4.2 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS PULMÕES DOS ANIMAIS IMUNIZADOS FRENTE INFECÇÃO POR *M. tuberculosis*

A fim de avaliar o comprometimento pulmonar ao longo da infecção, realizamos cortes histológicos nos pulmões dos animais imunizados pelas diferentes estratégias vacinais, 30 e 70 dias após infecção por *M. tuberculosis*.

Analisando histopatologicamente os pulmões dos animais não imunizados e não infectados (grupo PBS - Fig. 4A e 5A) constatamos ausência de processo inflamatório, 90 e 130 dias após o início do experimento, correspondendo a 30 e 70 dias após a infecção dos outros grupos estudados. Esses animais não apresentaram alterações histopatológicas, com parênquima pulmonar bem preservado, espaços alveolares bem delimitados, ausência de células inflamatórias no tecido e também brônquios e bronquíolos sem espessamento de suas paredes, além de lúmen normal.

Por outro lado, os pulmões dos animais não vacinados e infectados por *M. tuberculosis* (grupo TB) apresentaram no período mais precoce da infecção (Fig. 4C e 5B) comprometimento moderado do parênquima pulmonar e intenso processo inflamatório, com presença de granulomas dispersos. Apesar da presença de infiltrado inflamatório peri-arterial e peri-arteriolar, evidenciamos o predomínio de infiltrado inflamatório crônico peri-bronquiolar intenso, localização que denota padrão de infecção por via aérea, já que os animais foram infectados pela via intratraqueal. A predominância de infiltrados inflamatórios, devido à infecção por via aérea também é encontrada nos demais grupos experimentais. Observamos também que os granulomas são constituídos na sua região central por macrófagos xantomatosos e células gigantes (destaque Fig. 4C) e, na sua periferia principalmente por linfócitos, padrão típico observado na TB. Na fase crônica da infecção, 70 dias (Fig. 4D e 5C), verificamos um comprometimento mais acentuado do parênquima pulmonar, com a presença de infiltrado inflamatório intenso, diversos granulomas dispersos por todo parênquima, sendo esses constituídos por muitos macrófagos xantomatosos (destaque Fig. 4D).

O grupo dos animais que recebeu uma única dose da vacina BCG por via subcutânea (BCG) apresentou, tanto 30 (Fig. 4E e 5D) quanto 70 (Fig. 4F e 5E) dias após infecção, um padrão de comprometimento do parênquima pulmonar similar ao

grupo BCG-PVAX. Além de infiltrado linfocítico peri-bronquiolar, verificou-se também a presença de pequenos granulomas dispersos, sendo esses em maior número e com agregados linfocitários mais importantes 70 dias após a infecção. Não observamos a presença de células gigantes no período mais precoce da infecção, entretanto, um pequeno número destas células foi encontrado no período mais tardio da infecção.

O grupo que recebeu a estratégia de imunização heteróloga com a vacina BCG como primeira dose e pVAX-DMT-Me, por via intramuscular, como reforço (BCG-PVAX), apresentou 30 dias após infecção (Fig. 4G e 5F) um grau moderado de comprometimento do parênquima pulmonar com presença de granulomas dispersos, macrófagos xantomatosos e menor número de infiltrados linfóides do que o grupo BCG. Entretanto, os granulomas encontrados apresentaram tamanho similar àqueles presentes no grupo BCG. Setenta dias após a infecção (Fig. 4H e 5G), observamos um comprometimento do parênquima pulmonar também similar ao grupo BCG, com presença de granulomas pequenos e intenso infiltrado linfóide. Os macrófagos xantomatosos foram encontrados em menor número quando comparado ao período mais precoce da infecção, com a presença de raras células gigantes.

Quando os animais foram imunizados com o gene da proteína APA, através da estratégia de imunização heteróloga, recebendo o BCG como primeira dose e pVAX_{apa}-DMT-Me como reforço (BCG-APA), houve um menor comprometimento do parênquima pulmonar em relação aos outros grupos vacinados, com a presença de poucos granulomas e raros macrófagos xantomatosos, além da predominância de linfócitos, tanto 30 (Fig. 4I e 5H) quanto 70 (Fig. 4J e 5I) dias após infecção. Entretanto, na fase crônica verificamos que o parênquima pulmonar desses camundongos foi o mais bem preservado em relação a todos os grupos imunizados e principalmente em comparação ao grupo TB, apresentando-se muito similar ao grupo PBS. Esses achados corroboram com a excelente diminuição do número de bacilos encontrada no tecido pulmonar desses animais.

Assim, esses dados demonstram a eficácia da APA em induzir uma resposta imune pró-inflamatória necessária à eliminação de *M. tuberculosis* e indicam o grande potencial protetor da imunização heteróloga contendo *apa* (BCG-APA).

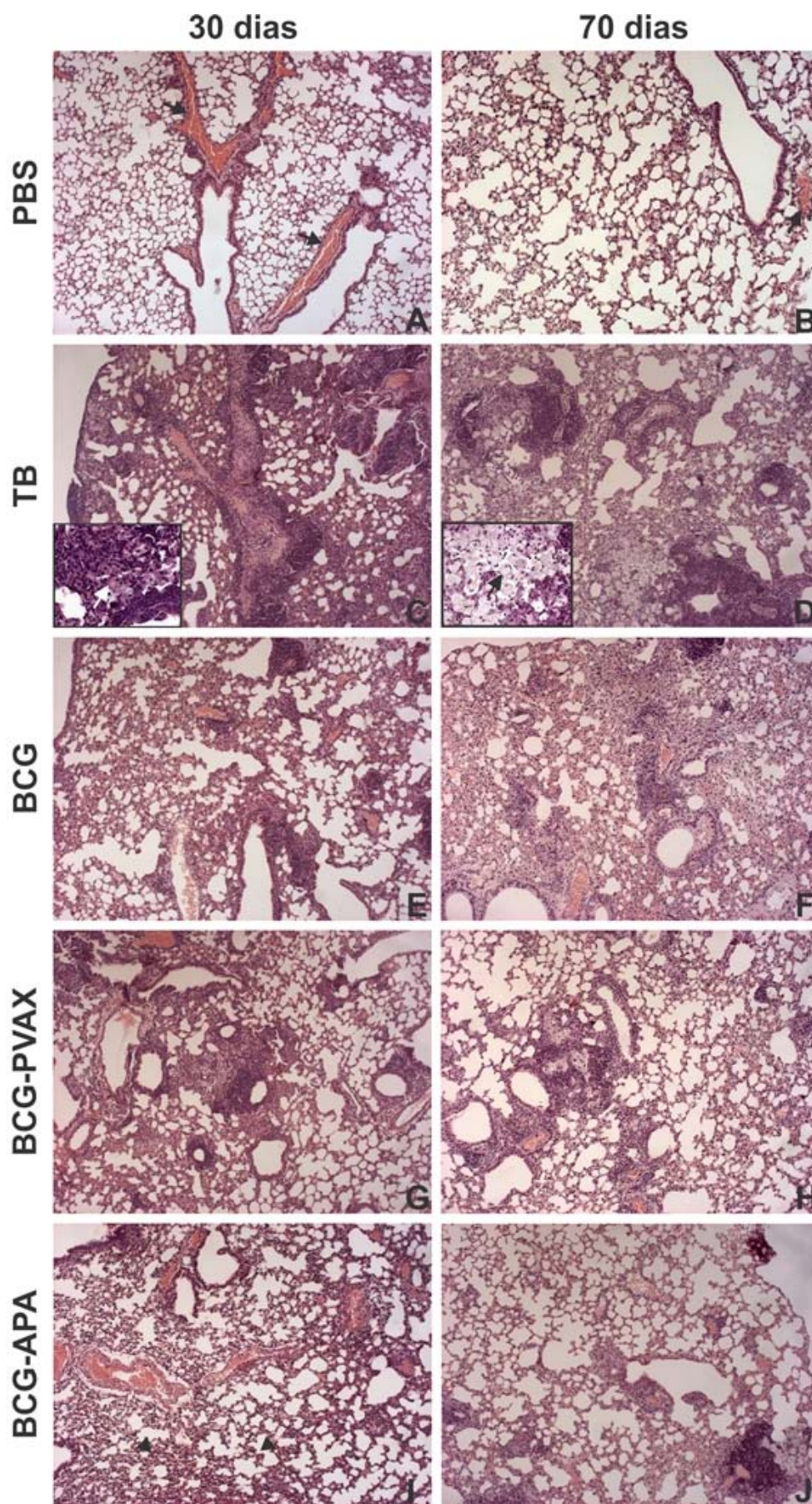


Figura 4 – Avaliação histopatológica dos pulmões dos animais imunizados por diferentes estratégias vacinais frente infecção por *M. tuberculosis*. Camundongos BALB/c (n=20) foram imunizados por via s.c. com uma única dose da vacina BCG (5×10^5 bacilos; grupo BCG); uma dose de BCG, via s.c., seguido por uma dose de pVAX-Me ou pVAX_{apa}-Me, via i.m., 30 dias após (BCG-PVAX; BCG-APA). Trinta dias após vacinação, os animais foram infectados com *M. tuberculosis* H37Rv (1×10^5 bacilos). 30 e 70 dias após infecção, os pulmões foram fixados em formol tamponado e corados com Hematoxilina-Eosina. Resultados expressos como cortes histológicos dos lóbulos pulmonares representativos dos grupos PBS (**A e B**), TB (**C e D**), BCG (**E e F**), BCG-PVAX (**G e H**) e BCG-APA (**I e J**). Setas indicam congestão dos vasos sanguíneos e as “pontas de setas” indicam colapso dos alvéolos pulmonares. Setas branca e preta no destaque (grupo TB) indicam célula gigante e macrófago xantomatoso, respectivamente. Aumento original de 100X. Aumento destaques de 400X.

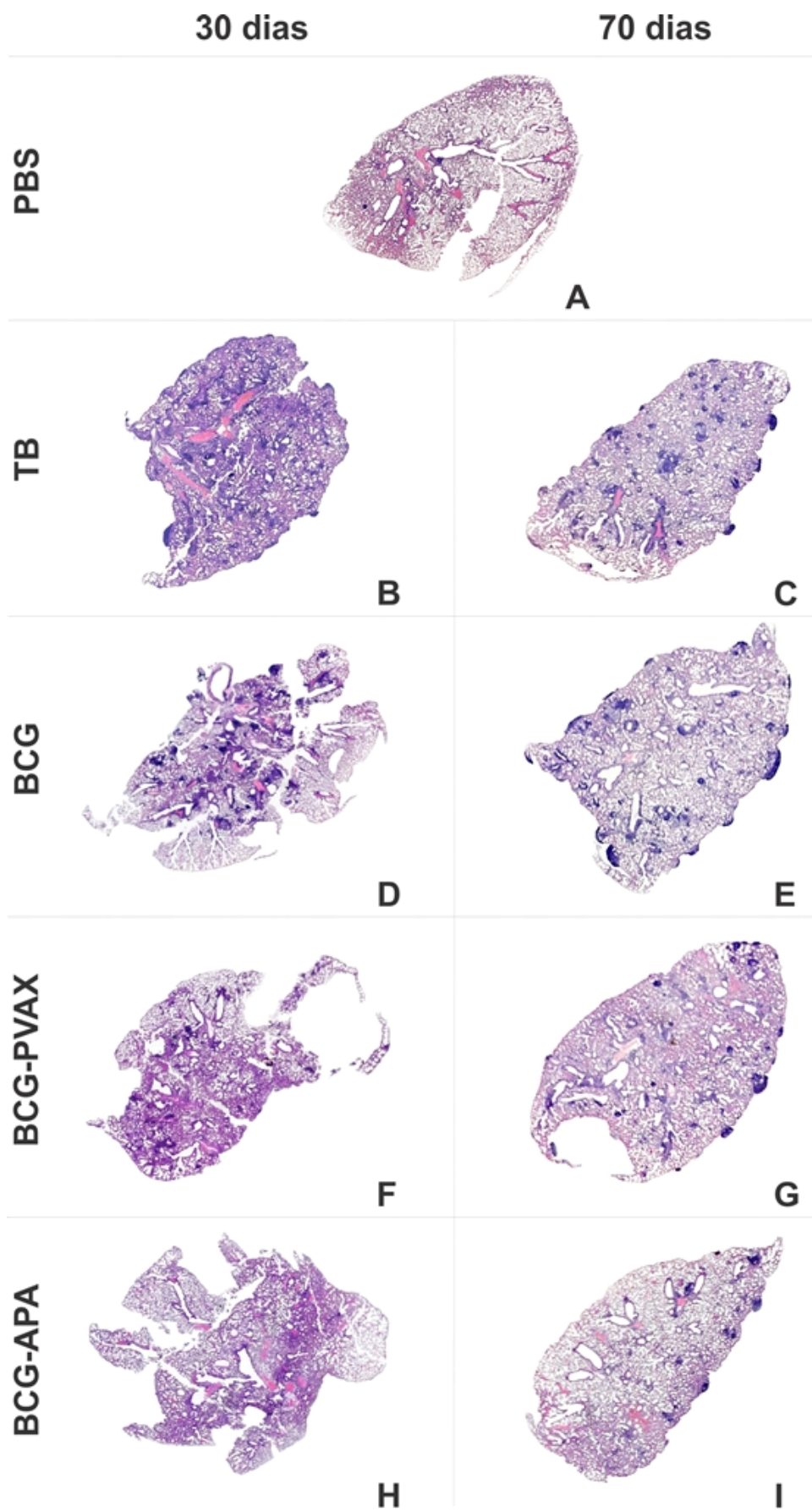


Figura 5 – Avaliação histopatológica dos pulmões dos animais imunizados por diferentes estratégias vacinais frente infecção por *M. tuberculosis*. Camundongos BALB/c (n=20) foram imunizados por via s.c. com uma única dose da vacina BCG (5×10^5 bacilos; grupo BCG); uma dose de BCG, via s.c., seguido por uma dose de pVAX-Me ou pVAX*apa*-Me, via i.m., 30 dias após (BCG-PVAX; BCG-APA). Trinta dias após vacinação, os animais foram infectados com *M. tuberculosis* H37Rv (1×10^5 bacilos). 30 e 70 dias após infecção, os pulmões foram fixados em formol tamponado e corados com Hematoxilina-Eosina. Resultados expressos visão geral dos lóbulos pulmonares representativos dos grupos PBS (**A**), TB (**B e C**), BCG (**D e E**), BCG-PVAX (**F e G**) e BCG-APA (**H e I**).

5 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo principal investigar a proteção de uma formulação vacinal após desafio por *M. tuberculosis*. Essa preparação é constituída de uma vacina gênica, na qual o gene da proteína APA é associado ao adjuvante DMT e ambos encapsulados com microesferas. Essa formulação foi utilizada como vacina-reforço ao BCG no modelo murino BALB/c. A avaliação foi realizada através da contagem da carga bacteriana e da histopatologia nos pulmões dos animais imunizados e infectados na fase aguda (30 dias após o desafio) e crônica (70 dias após o desafio) da doença experimental, avaliando a capacidade dessa estratégia vacinal em induzir uma resposta imune protetora de longa duração.

É indiscutível, segundo alguns autores, a contribuição da vacinação para a eliminação global da TB nas próximas décadas (Young & Dye, 2006; Maher *et al.*, 2007). Nesse sentido, vários grupos de pesquisa têm concentrado seus esforços no desenvolvimento de estratégias de vacinação baseadas na vacina BCG. Essa vacina é considerada o “padrão ouro”, sendo referência às vacinas candidatas testadas. Deste modo, a administração de formulações que reforcem a imunidade induzida pelo BCG vem sendo uma estratégia muito atraente e bastante estudada. Nesse contexto, vacinas gênicas expressando proteínas associadas a adjuvantes, dentre outras, mostraram-se promissoras quando utilizadas em uma abordagem de imunização heteróloga juntamente com o BCG (Tchilian, 2009; Derrick, 2004; Von Eschen, 2009).

Diversos antígenos testados dentro deste protocolo, já haviam demonstrado excelente capacidade de induzir resposta imune celular protetora na TB, caracterizada pela ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória produtoras de citocinas Th1, capazes de ativar os mecanismos microbicidas de macrófagos infectados e, conseqüentemente, controlar a infecção (Mcshane *et al.*, 2004; Weinrich Olsen, 2001; Johansen *et al.*, 2003; Dey *et al.*, 2011; Guerrero & Locht, 2011; Sable *et al.*, 2011). Dentre estes, o antígeno APA vem sendo utilizado em vacinas contra TB e tem se apresentado muito promissor por sua capacidade de induzir resposta imune eficaz nos modelos murino e cobaia (Garapin *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2003; Ferraz *et al.*, 2004).

Primeiramente, foi demonstrado que o DNA nu da proteína APA foi capaz de induzir intensa resposta Th1 e Th2 em cobaias, bem como efeito protetor significativo frente infecção por *M. tuberculosis* em camundongos (Garapin *et al.*, 2001). Em um estudo posterior foi sugerido que a atividade de células T antígeno-específicas à APA proveniente de PBMC de indivíduos PPD⁺, avaliada através da produção de IFN- γ e da linfoproliferação, correlacionava com a importante resposta imune protetora em cobaias induzida pela vacina gênica contendo *apa* (Kumar *et al.*, 2003). Além disso, a APA foi utilizada em uma construção vacinal juntamente com proteínas de choque térmico (Hsp65 e Hsp70), num contexto de imunização heteróloga, como dose de reforço ao BCG e foi demonstrado que essa vacina induziu significativa redução de micobactérias no pulmão dos animais imunizados, além de importante resposta imune celular Th1 (Ferraz *et al.*, 2004). Em contrapartida, quando esta formulação foi utilizada em uma única dose em bovinos não demonstrou proteção, porém quando combinada no contexto de imunização heteróloga com BCG a mesma foi capaz de induzir maior proteção do que a vacina BCG. Essa análise foi baseada em parâmetros histopatológicos e microbiológicos, e a proteção avaliada após desafio com *M. bovis*. Apesar do grupo BCG ter apresentado altos níveis de IFN- γ não foi observado proteção similar à induzida pela estratégia de imunização heteróloga contendo *apa*, no que se refere a diminuição da carga bacilar e ao controle do processo inflamatório pulmonar (Skinner, *et al.*, 2003).

Baseado nas características imunogênicas e protetoras desse antígeno, uma estratégia vacinal utilizando a vacina gênica pVAX*apa* associada ao adjuvante DMT, encapsulados em microesferas biodegradáveis, foi desenvolvida e utilizada como reforço ao BCG, e testada em camundongos BALB/c. Em estudo anterior avaliamos o potencial imunogênico dessa estratégia e verificamos que a mesma foi capaz de induzir uma resposta imune de padrão misto Th1 e Th2, bem como aumento na frequência de células T efectoras de memória em comparação à vacina atual BCG (Carlétti, 2008). Assim, com base nestes resultados, neste estudo avaliamos a proteção induzida por este protocolo de imunização após desafio com a cepa *M. tuberculosis* H37Rv e verificamos que este sistema de imunização heteróloga foi eficiente no controle da carga bacteriana, associada a uma melhor preservação do parênquima pulmonar, principalmente na fase crônica da infecção, em comparação ao BCG.

Na análise da recuperação de unidades formadoras de colônia (UFC), nossos dados demonstraram que a vacinação dos animais só com BCG, ou após a administração do vetor (BCG-PVAX), reduziu o número de bacilos recuperados do pulmão de animais infectados, apresentando padrões similares, tanto 30 (Fig. 3A) quanto 70 (Fig. 3B) dias após a infecção. Entretanto, o menor nível de proteção induzido pelo BCG ou BCG-pVAX após infecção poderia ser explicado pelo fato de que quando a vacinação com BCG é utilizada, a imunidade celular desenvolve-se num microambiente de padrão misto de resposta, com altos níveis de IFN- γ e IL-4 nos linfonodos murinos, levando à perda da capacidade citotóxica das células T e à redução da diferenciação de células de memória (Silva *et al.*, 1999). Hipoteticamente, devido ao fato dessas vacinas não induzirem um melhor controle da proliferação do bacilo, essas citocinas seriam produzidas de forma alterada no sítio da infecção comprometendo a resposta celular a *M. tuberculosis*, uma vez que a IL-4 poderia estar inibindo a expressão de óxido nítrico sintase (iNOS) e a atividade microbicida dos macrófagos (Rook *et al.*, 2005). Entretanto, mais estudos devem ser realizados para elucidar esse fenômeno. Esse padrão de resposta leva ao controle da carga bacteriana, mas não há diminuição dos bacilos ao longo do tempo, como foi observado nos nossos resultados na fase crônica da infecção. Em contrapartida, verificamos que a inclusão do gene *apa* na formulação vacinal potencializou a resposta imune protetora, induzindo maior redução no número de bacilos recuperados dos pulmões dos animais no período mais tardio da infecção, sugerindo que a APA é capaz de amplificar a proteção induzida previamente pelo BCG.

Nossos resultados de proteção baseados na carga bacilar encontrada nos pulmões dos animais vacinados corroboram com alguns estudos recentes que utilizam a estratégia de imunização heteróloga com outras proteínas de *M. tuberculosis*. Recentemente, Wang e colaboradores mostraram que 3 doses da vacina de DNA, codificando os antígenos CFP21 e MPT64, apresentaram melhor proteção frente infecção por uma cepa virulenta de micobactéria (H37Rv) quando comparada aos grupos que receberam somente o BCG ou somente o DNA nu (Wang *et al.*, 2011). Do mesmo modo, foi demonstrado que três doses da vacina gênica codificando a associação entre Ag85A e GM-CSF, administrada como reforço do BCG, além de proporcionar um efeito protetor superior ao induzido somente pelo

BCG no pulmão de camundongos infectados, via intravenosa, por *M. tuberculosis*, também foi capaz de induzir proteção no fígado e no baço destes animais (Dou *et al.*, 2010). Entretanto, em nossos resultados não observamos diferença estatística entre os grupos vacinados na diminuição de bacilos no baço dos camundongos, tanto 30 (Fig. 4A) quanto 70 (Fig. 4A) dias após a infecção, o que possivelmente se deve ao fato dos animais terem sido infectados pela via intratraqueal, conduzindo os bacilos diretamente ao pulmão (sítio da infecção), mimetizando a infecção natural, e não para o baço. Neste sítio, pulmão, ocorre a produção de citocinas e quimiocinas capazes de induzir o recrutamento de células que irão combater a infecção e destruir os bacilos, diminuindo assim a carga bacteriana nesse órgão. Algumas bactérias são conduzidas a outros órgãos secundários, como o baço, porém nesses não é desenvolvida uma resposta imune eficaz capaz de controlar a infecção, uma vez que as células ativadas nesses órgãos são recrutadas para o sítio da infecção.

É importante ressaltar que nesses dois estudos foram utilizadas 3 doses das respectivas vacinas gênicas para induzir proteção significativa na TB experimental, enquanto que no nosso estudo foi utilizada uma única dose da vacina APA-DNA para atingir proteção similar, até num período mais tardio da infecção. Estes resultados sugerem que as microesferas biodegradáveis utilizadas na construção pVAX_{apa} podem ter sido eficazes no auxílio da proteção do DNA contra as enzimas presentes no microambiente, além de permitirem a liberação gradativa do antígeno APA por um período mais prolongado. Essa seria a grande vantagem em relação às demais formulações já testadas, uma vez que a liberação controlada do antígeno é eficaz na manutenção do estímulo ao sistema imune do hospedeiro, mimetizando doses de reforço.

Outro fator que poderia interferir nos resultados obtidos é o adjuvante utilizado, o qual também pode direcionar o padrão da resposta imune e consequentemente a eficácia protetora da vacina. O DMT tem sido utilizado no favorecimento da resposta Th1, como demonstrado por Lima e colaboradores (2001), que observaram o importante papel desse adjuvante no recrutamento de células para formação do granuloma e produção de mediadores imunológicos fundamentais para o controle da TB. Por outro lado, na micobactéria o DMT auxilia na inibição da fusão fago-lisossoma, devido às proeminências da porção hidrofílica desse glicolípido, as quais permitem o aumento da hidratação ao redor da vesícula,

promovendo o bloqueio dessa fusão (Spargo, 1991). Desse modo, dentro da microesfera o DMT poderia retardar a degradação do DNA inserido dentro dos polímeros, pelas nucleases presentes no sítio de inoculação, o que prolongaria a manutenção da ativação das células envolvidas na proteção.

Avaliamos também o efeito protetor das estratégias vacinais sobre a histopatologia do pulmão dos animais infectados por *M. tuberculosis* nas fases mais precoce (30 dias) e tardia (70 dias) da infecção. Uma etapa crucial na geração de uma resposta imune pulmonar específica é o recrutamento de células inflamatórias para o parênquima pulmonar, especialmente linfócitos. Relativamente, poucas dessas células habitam os espaços alveolares e o interstício pulmonar de hospedeiros normais (Curtis *et al.*, 1990). Esse padrão de resposta pulmonar foi encontrado nos pulmões dos animais do grupo TB, sugerindo intenso influxo de células inflamatórias para o sítio da infecção, entretanto, muitas dessas células estavam presentes no interstício e entre os alvéolos pulmonares, apresentando alto grau de comprometimento do parênquima pulmonar. Por outro lado, não há sinais de recrutamento dessas células para o pulmão dos animais que não foram desafiados (PBS), o que já era esperado. Trinta dias após a infecção, dentre os grupos vacinais o grupo BCG-APA apresentou o menor número de linfócitos no parênquima pulmonar, enquanto que na fase tardia da infecção o grupo BCG-APA apresentou maior redução do infiltrado inflamatório. Essa redução foi caracterizada por uma menor inflamação no parênquima pulmonar e pela presença de pequenos granulomas formados por grupos reduzidos de células, quando comparado aos grupos vacinais BCG e BCG-PVAX. Através dessa análise podemos sugerir que essa estratégia vacinal se mostrou muito importante, pois, além de levar a um efeito protetor significativo contra o *M. tuberculosis*, ela foi capaz de controlar o influxo exacerbado de células efetoras para o sítio de infecção, o que poderia causar o dano tecidual através do desenvolvimento de uma resposta imune local mais acentuada, preservando o parênquima pulmonar.

Além dos linfócitos, macrófagos também participam da formação inicial da resposta imune protetora contra *M. tuberculosis*, sendo células essenciais para o controle da multiplicação micobacteriana. Os macrófagos infectados recrutam outros macrófagos e outras células do sistema imunológico para formar estruturas organizadas chamadas granulomas, características da TB (Dannenber, 1993;

Cosma *et al.*, 2003). Para a formação do granuloma, esses macrófagos se diferenciam em vários tipos celulares, incluindo células gigantes multi-nucleadas, e também em macrófagos xantomatosos, os quais podem fagocitar lipídeos presentes no parênquima dando a essas células um aspecto esponjoso (Ulrichs e Kaufmann, 2006; Caceres *et al.*, 2009). Os macrófagos xantomatosos são células que contêm grande quantidade de lipídeos presentes no seu interior, oriundos da desregulação do balanço entre o influxo e efluxo de lipoproteínas de baixa densidade provenientes do sangue periférico. Essas células auxiliam na amplificação da resposta imune através da produção de prostaglandina E2 e leucotrienos (Russel *et al.*, 2009). Nossos resultados mostraram que, assim como o grupo TB, poucas células gigantes estavam presentes nos grupos BCG e BCG-PVAX, 30 dias após infecção, apresentando granulomas de tamanhos similares. Essa formação é característica de uma boa contenção do bacilo no interior dos granulomas, porém a evolução da infecção tomou rumos diferentes em dois destes grupos. Podemos verificar na fase crônica da infecção que o grupo BCG-PVAX apresentou uma melhora do comprometimento do parênquima pulmonar com a presença de poucos macrófagos xantomatosos, enquanto o grupo TB apresentou um agravamento do parênquima pulmonar, além de apresentar grande número de macrófagos xantomatosos nas regiões de granuloma. Podemos sugerir que, em uma análise num período ainda mais tardio, o parênquima pulmonar dos animais do grupo TB poderia estar mais agravado pela infecção, o que levaria a uma pneumonia lipídica elevada, tipicamente ocasionada pelos alvéolos repletos de macrófagos xantomatosos. Essas células são elementos-chave na manutenção da persistência bacteriana e contribuem para o agravamento da patologia do tecido, levando à formação do caseo e disseminação dos bacilos infecciosos (Russel *et al.*, 2009). Esse fenômeno não foi observado nos grupos BCG e BCG-APA, provavelmente porque nesses dois grupos os granulomas eram constituídos por poucos ou nenhum macrófago xantomatoso, além do processo infeccioso não chegar a esse grau de agravamento do parênquima em camundongos BALB/c, por ser um modelo experimental resistente à TB.

A gravidade do dano tecidual causado pela inflamação também é um dos parâmetros de avaliação do comprometimento tecidual induzido por um patógeno, em especial *M. tuberculosis* (Curtis *et al.*, 1990). Baseado nesse critério, nossos resultados mostraram que o parênquima pulmonar dos animais vacinados com BCG

apresentou dano tecidual similar ao observado nos animais infectados e não vacinados, tanto 30 (Fig. 5E) quanto 70 (Fig. 5F) dias após a infecção. Embora a inoculação do plasmídeo pVAX-DMT-Me tenha diminuído o número de bacilos recuperados dos pulmões dos animais infectados, a mesma não reduziu totalmente a lesão do parênquima pulmonar induzida pelo desafio com *M. tuberculosis* (Fig. 5G e 5H). Ao contrário, quando imunizamos os animais com a formulação contendo *apa*, verificamos a redução do número e tamanho dos granulomas, corroborando com a diminuição dos bacilos presentes no tecido (Fig. 5I e 5J). Além disso, a extensão da lesão induzida pela infecção com *M. tuberculosis* também foi reduzida pela formulação contendo *apa*, apresentando inflamação pulmonar muito limitada e pequena formação de granulomas em torno do tecido alveolar, o que também foi observado por Wang e colaboradores (Wang *et al.*, 2011). Em contrapartida, outro estudo utilizando a mesma estratégia, administrando o BCG em camundongos neonatos e o reforço com a vacina gênica, que codifica a proteína Hsp65, na idade adulta (4 semanas após o BCG), apresentou demonstrou um efeito paradoxal dessa estratégia. A mesma foi altamente imunogênica, com produção de IFN- γ e IL-5 (padrão Th1/Th2), entretanto, não foi protetora frente infecção com *M. tuberculosis*, apresentando intenso infiltrado inflamatório dominado por células mononucleares no pulmão dos camundongos vacinados e infectados (Pelizon *et al.*, 2010). Por outro lado, em outro trabalho do mesmo grupo foi demonstrado que a utilização dessa estratégia, administrando tanto o BCG quanto a Hsp65 por via intranasal na idade adulta, apresentou proteção tanto 30 quanto 70 dias após infecção, caracterizada através da diminuição da carga bacilar e da melhor preservação do parênquima pulmonar dos animais imunizados (Gonçalves *et al.*, 2007).

Os dados apresentados neste trabalho podem contribuir para o melhor entendimento das respostas inflamatória e imune observadas em animais infectados com *M. tuberculosis*. Nos nossos resultados verificamos que a vacinação com uma só dose de BCG não foi capaz de impedir a inflamação no parênquima pulmonar dos camundongos infectados, não resultando numa resposta protetora tão eficaz quanto a obtida com a pVAX apa , avaliada através da diminuição do número de bactérias nos pulmões. Já a inoculação da vacina gênica contendo o antígeno APA mostrou-se eficaz na redução do número de bacilos no pulmão dos animais e também da lesão do parênquima pulmonar induzida pela infecção.

Por fim, a imunização heteróloga BCG-APA é atraente, pois não exclui a vacinação com BCG na infância e enfatiza a importância desta estratégia no controle da TB em países onde essa doença é endêmica. Apesar do modelo murino ser a primeira etapa importante para determinar a natureza da resposta imune, assim como a capacidade protetora dos antígenos, esse modelo não prediz necessariamente o resultado que será obtido em humanos. Entretanto, os resultados aqui demonstrados apontam essa estratégia como muito promissora à profilaxia da TB e nos estimula a continuar buscando uma vacina que otimize a proteção conferida pelo BCG.

6 CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos através do presente estudo podemos concluir que:

- A formulação vacinal pVAX_{apa}, associada ao adjuvante DMT e encapsulada em microesferas de PLGA (pVAX_{apa}-DMT-Me), utilizada como reforço da vacina BCG num contexto de imunização heteróloga (grupo BCG-APA) em camundongos, induziu resposta imune protetora frente a infecção por *M. tuberculosis*, caracterizada pela redução do número de bacilos no pulmão destes animais, na fase mais tardia da infecção (70 dias após desafio), quando comparado ao BCG;
- A imunização heteróloga com BCG-APA permitiu uma melhor preservação do parênquima pulmonar e controle do processo inflamatório, quando comparada ao grupo BCG, 70 dias após a infecção;
- Estes dados sugerem que o antígeno APA é capaz de amplificar a proteção induzida previamente pela vacina BCG.

7 REFERÊNCIAS

Aagaard C, Dietrich J, Doherty M, Andersen P. TB vaccines: current status and future perspectives. *Immunol Cell Biol.* 2009 May-Jun;87(4):279-86.

Abebe F, Bjune G. The protective role of antibody responses during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Exp Immunol.* 2009 Aug;157(2):235-43.

Abel B, Tameris M, Mansoor N, Gelderbloem S, Hughes J, Abrahams D, 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 Jun 15;181(12):1407-17.

Akira S. Toll receptor families: structure and function. *Semin Immunol.* 2004 Feb;16(1):1-2.

Altare F, Durandy A, Lammas D, Emile JF, Lamhamedi S, Le Deist F, et al. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science.* 1998 May 29;280(5368):1432-5.

Andersen P. The T cell response to secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunobiology.* 1994 Oct;191(4-5):537-47.

Andersen P. TB vaccines: progress and problems. *Trends Immunol.* 2001 Mar;22(3):160-8.

Antas PR, Castelo-Branco LR. New vaccines against tuberculosis: lessons learned from BCG immunisation in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008 Jul;102(7):628-30.

Barreto ML, Pereira SM, Ferreira AA. BCG vaccine: efficacy and indications for vaccination and revaccination. *J Pediatr (Rio J).* 2006 Jul;82(3 Suppl):S45-54.

Bean AG, Roach DR, Briscoe H, France MP, Korner H, Sedgwick JD, et al. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J Immunol.* 1999 Mar 15;162(6):3504-11.

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

Betts JC. Transcriptomics and proteomics: tools for the identification of novel drug targets and vaccine candidates for tuberculosis. *IUBMB Life.* 2002 Apr-May;53(4-5):239-42.

Bonato VL, Goncalves ED, Soares EG, Santos Junior RR, Sartori A, Coelho-Castelo AA, et al. Immune regulatory effect of pHSP65 DNA therapy in pulmonary

tuberculosis: activation of CD8+ cells, interferon-gamma recovery and reduction of lung injury. *Immunology*. 2004 Sep;113(1):130-8.

Bosio CM, Gardner D, Elkins KL. Infection of B cell-deficient mice with CDC 1551, a clinical isolate of *Mycobacterium tuberculosis*: delay in dissemination and development of lung pathology. *J Immunol*. 2000 Jun 15;164(12):6417-25.

Brandt L, Elhay M, Rosenkrands I, Lindblad EB, Andersen P. ESAT-6 subunit vaccination against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 2000 Feb;68(2):791-5.

Brewer TF, Colditz GA. Relationship between bacille Calmette-Guerin (BCG) strains and the efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 1995 Jan;20(1):126-35.

Caceres N, Tapia G, Ojanguren I, Altare F, Gil O, Pinto S, et al. Evolution of foamy macrophages in the pulmonary granulomas of experimental tuberculosis models. *Tuberculosis (Edinb)*. 2009 Mar;89(2):175-82.

Cardona PJ. RUTI: a new chance to shorten the treatment of latent tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb)*. 2006 May-Jul;86(3-4):273-89.

Cardona PJ. [Therapeutic vaccines against tuberculosis: a glowing future]. *Arch Bronconeumol*. 2007 Nov;43(11):591-3.

Carlétti DS. Desenvolvimento de vacinas: caracterização da resposta imunogênica à preparação vacinal pVAXapa em modelo murino. [Monografia]. Niterói: Universidade Federal Fluminense; 2008.

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*. 1999 May 1;162(9):5407-16.

Cebere I, Dorrell L, McShane H, Simmons A, McCormack S, Schmidt C, et al. Phase I clinical trial safety of DNA- and modified virus Ankara-vectored human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vaccines administered alone and in a prime-boost regime to healthy HIV-1-uninfected volunteers. *Vaccine*. 2006 Jan 23;24(4):417-25.

Chakravarty SD, Zhu G, Tsai MC, Mohan VP, Marino S, Kirschner DE, et al. Tumor necrosis factor blockade in chronic murine tuberculosis enhances granulomatous inflammation and disorganizes granulomas in the lungs. *Infect Immun*. 2008 Mar;76(3):916-26.

Chanteau S, Rasolofo V, Rasolonavalona T, Ramarokoto H, Horn C, Auregan G, et al. 45/47 kilodalton (APA) antigen capture and antibody detection assays for the diagnosis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000 Apr;4(4):377-83.

Coelho-Castelo AA, Trombone AP, Rosada RS, Santos RR, Jr., Bonato VL, Sartori A, et al. Tissue distribution of a plasmid DNA encoding Hsp65 gene is dependent on the dose administered through intramuscular delivery. *Genet Vaccines Ther.* 2006;4:1.

Colditz GA, Berkey CS, Mosteller F, Brewer TF, Wilson ME, Burdick E, et al. The efficacy of bacillus Calmette-Guerin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis: meta-analyses of the published literature. *Pediatrics.* 1995 Jul;96(1 Pt 1):29-35.

Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, et al. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA.* 1994 Mar 2;271(9):698-702.

Collins HL, Kaufmann SH. Prospects for better tuberculosis vaccines. *Lancet Infect Dis.* 2001 Aug;1(1):21-8.

Cooper AM. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:393-422.

Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med.* 1993 Dec 1;178(6):2243-7.

Cooper AM, Flynn JL. The protective immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Opin Immunol.* 1995 Aug;7(4):512-6.

Cooper AM, Magram J, Ferrante J, Orme IM. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med.* 1997 Jul 7;186(1):39-45.

Cosma CL, Sherman DR, Ramakrishnan L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2003;57:641-76.

Crampin AC, Glynn JR, Fine PE. What has Karonga taught us? Tuberculosis studied over three decades. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2009 Feb;13(2):153-64.

Curtis JL, Warnock ML, Arraj SM, Kaltreider HB. Histologic analysis of an immune response in the lung parenchyma of mice. Angiopathy accompanies inflammatory cell influx. *Am J Pathol.* 1990 Sep;137(3):689-99.

Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science.* 1993 Mar 19;259(5102):1739-42.

Dannenbergs AM, Jr. Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol Today.* 1991 Jul;12(7):228-33.

Dannenber AM, Jr. Immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Hosp Pract (Off Ed)*. 1993 Jan 15;28(1):51-8.

Dannenber AM, Jr. Roles of cytotoxic delayed-type hypersensitivity and macrophage-activating cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunobiology*. 1994 Oct;191(4-5):461-73.

Dantas OM, Ximenes RA, de Albuquerque Mde F, da Silva NL, Montarroyos UR, de Souza WV, et al. A case-control study of protection against tuberculosis by BCG revaccination in Recife, Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006 May;10(5):536-41.

Davis JM, Ramakrishnan L. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell*. 2009 Jan 9;136(1):37-49.

de Jong R, Altare F, Haagen IA, Elferink DG, Boer T, van Breda Vriesman PJ, et al. Severe mycobacterial and Salmonella infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science*. 1998 May 29;280(5368):1435-8.

de Paula L, Silva CL, Carlos D, Matias-Peres C, Sorgi CA, Soares EG, et al. Comparison of different delivery systems of DNA vaccination for the induction of protection against tuberculosis in mice and guinea pigs. *Genet Vaccines Ther*. 2007;5:2.

Derrick SC, Yang AL, Morris SL. A polyvalent DNA vaccine expressing an ESAT6-Ag85B fusion protein protects mice against a primary infection with *Mycobacterium tuberculosis* and boosts BCG-induced protective immunity. *Vaccine*. 2004 Dec 21;23(6):780-8.

Dey B, Jain R, Gupta UD, Katoch VM, Ramanathan VD, Tyagi AK. A booster vaccine expressing a latency-associated antigen augments BCG induced immunity and confers enhanced protection against tuberculosis. *PLoS One*. 2011;6(8):e23360.

Diagbouga S, Fumoux F, Zoubga A, Sanou PT, Marchal G. Immunoblot analysis for serodiagnosis of tuberculosis using a 45/47-kilodalton antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1997 May;4(3):334-8.

Divangahi M, Desjardins D, Nunes-Alves C, Remold HG, Behar SM. Eicosanoid pathways regulate adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Immunol*. 2010 Aug;11(8):751-8.

Dlugovitzky D, Fiorenza G, Farroni M, Bogue C, Stanford C, Stanford J. Immunological consequences of three doses of heat-killed *Mycobacterium vaccae* in the immunotherapy of tuberculosis. *Respir Med*. 2006 Jun;100(6):1079-87.

Dobos KM, Khoo KH, Swiderek KM, Brennan PJ, Belisle JT. Definition of the full extent of glycosylation of the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*. 1996 May;178(9):2498-506.

Dorhoi A, Kaufmann SH. Fine-tuning of T cell responses during infection. *Curr Opin Immunol*. 2009 Aug;21(4):367-77.

Dou J, Tang Q, Yu F, Yang H, Zhao F, Xu W, et al. Investigation of immunogenic effect of the BCG priming and Ag85A- GM-CSF boosting in Balb/c mice model. *Immunobiology*. 2010;215(2):133-42.

Dou J, Tang Q, Zhao F. Comparison of immune responses induced in mice by vaccination with DNA vaccine constructs expressing mycobacterial antigen 85A and interleukin -21 and bacillus Calmette-Guerin. *Immunol Invest*. 2008.

Dye C, Maher D, Weil D, Espinal M, Raviglione M. Targets for global tuberculosis control. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006 Apr;10(4):460-2.

Eldridge JH, Staas JK, Meulbroek JA, McGhee JR, Tice TR, Gilley RM. Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. *Mol Immunol*. 1991 Mar;28(3):287-94.

Epps HL. Chemokine drives tuberculosis. *J Exp Med*. 2005 December 19;202(12):1614.

Erb KJ, Kirman J, Delahunt B, Chen W, Le Gros G. IL-4, IL-5 and IL-10 are not required for the control of *M. bovis*-BCG infection in mice. *Immunol Cell Biol*. 1998 Feb;76(1):41-6.

Ferraz JC, Stavropoulos E, Yang M, Coade S, Espitia C, Lowrie DB, et al. A heterologous DNA priming-Mycobacterium bovis BCG boosting immunization strategy using mycobacterial Hsp70, Hsp65, and Apa antigens improves protection against tuberculosis in mice. *Infect Immun*. 2004 Dec;72(12):6945-50.

Fine PE. The BCG story: lessons from the past and implications for the future. *Rev Infect Dis*. 1989 Mar-Apr;11 Suppl 2:S353-9.

Fine PE. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet*. 1995 Nov 18;346(8986):1339-45.

Fine PE, Floyd S, Stanford JL, Nkhosa P, Kasunga A, Chaguluka S, et al. Environmental mycobacteria in northern Malawi: implications for the epidemiology of tuberculosis and leprosy. *Epidemiol Infect*. 2001 Jun;126(3):379-87.

Fine PEM, Carneiro A. M., Milstein J. B., Clements J.C. Issues relating to the use of BCG in immunization programmes. A discussion document. World Health Organization. 1999.

Flesch I, Kaufmann SH. Mycobacterial growth inhibition by interferon-gamma-activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 1987 Jun 15;138(12):4408-13.

Fletcher HA, Pathan AA, Berthoud TK, Dunachie SJ, Whelan KT, Alder NC, et al. Boosting BCG vaccination with MVA85A down-regulates the immunoregulatory cytokine TGF-beta1. *Vaccine*. 2008 Sep 26;26(41):5269-75.

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

Flynn JL, Chan J. What's good for the host is good for the bug. *Trends Microbiol*. 2005 Mar;13(3):98-102.

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*. 1993 Dec 1;178(6):2249-54.

Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, et al. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*. 1995 Jun;2(6):561-72.

Fonseca DM, Silva CL, Paula MO, Soares EG, Marchal G, Horn C, et al. Increased levels of interferon-gamma primed by culture filtrate proteins antigen and CpG-ODN immunization do not confer significant protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology*. 2007 Aug;121(4):508-17.

Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Tuberculosis. *Lancet*. 2003 Sep 13;362(9387):887-99.

Garapin A, Ma L, Pescher P, Lagranderie M, Marchal G. Mixed immune response induced in rodents by two naked DNA genes coding for mycobacterial glycosylated proteins. *Vaccine*. 2001 Apr 6;19(20-22):2830-41.

Garcia I, Miyazaki Y, Marchal G, Lesslauer W, Vassalli P. High sensitivity of transgenic mice expressing soluble TNFR1 fusion protein to mycobacterial infections: synergistic action of TNF and IFN-gamma in the differentiation of protective granulomas. *Eur J Immunol*. 1997 Dec;27(12):3182-90.

Geisel RE, Sakamoto K, Russell DG, Rhoades ER. In vivo activity of released cell wall lipids of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin is due principally to trehalose mycolates. *J Immunol*. 2005 Apr 15;174(8):5007-15.

Gil O, Vilaplana C, Guirado E, Diaz J, Caceres N, Singh M, et al. Enhanced gamma interferon responses of mouse spleen cells following immunotherapy for tuberculosis relapse. *Clin Vaccine Immunol*. 2008 Nov;15(11):1742-4.

Ginsberg AM. What's new in tuberculosis vaccines? *Bull World Health Organ*. 2002;80(6):483-8.

Goncalves ED, Bonato VL, da Fonseca DM, Soares EG, Brandao IT, Soares AP, et al. Improve protective efficacy of a TB DNA-HSP65 vaccine by BCG priming. *Genet Vaccines Ther*. 2007;5:7.

Goonetilleke NP, McShane H, Hannan CM, Anderson RJ, Brookes RH, Hill AV. Enhanced immunogenicity and protective efficacy against Mycobacterium tuberculosis of bacille Calmette-Guerin vaccine using mucosal administration and boosting with a recombinant modified vaccinia virus Ankara. *J Immunol*. 2003 Aug 1;171(3):1602-9.

Greenberg D, Hingston G, Harman J. Chest Wall Tuberculosis. *Breast J*. 1999 Jan;5(1):60-2.

Grode L, Seiler P, Baumann S, Hess J, Brinkmann V, Nasser Eddine A, et al. Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin. *J Clin Invest*. 2005 Sep;115(9):2472-9.

Guerrero GG, Locht C. Recombinant HBHA boosting effect on BCG-induced immunity against Mycobacterium tuberculosis infection. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:730702.

Guerrero GG, Debie AS, Locht C. Boosting with mycobacterial heparin-binding haemagglutinin enhances protection of Mycobacterium bovis BCG-vaccinated newborn mice against M. tuberculosis. *Vaccine*. 2010 Jun 17;28(27):4340-7.

Guirado E, Amat I, Gil O, Diaz J, Arcos V, Caceres N, et al. Passive serum therapy with polyclonal antibodies against Mycobacterium tuberculosis protects against post-chemotherapy relapse of tuberculosis infection in SCID mice. *Microbes Infect*. 2006 Apr;8(5):1252-9.

Guler R, Olleros ML, Vesin D, Parapanov R, Garcia I. Differential effects of total and partial neutralization of tumor necrosis factor on cell-mediated immunity to Mycobacterium bovis BCG infection. *Infect Immun*. 2005 Jun;73(6):3668-76.

Gupta UD, Katoch VM. Animal models of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2005 Sep-Nov;85(5-6):277-93.

Guyot-Revol V, Innes JA, Hackforth S, Hinks T, Lalvani A. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Apr 1;173(7):803-10.

Hanke T, Blanchard TJ, Schneider J, Hannan CM, Becker M, Gilbert SC, et al. Enhancement of MHC class I-restricted peptide-specific T cell induction by a DNA prime/MVA boost vaccination regime. *Vaccine*. 1998 Mar;16(5):439-45.

Hanke T, McMichael A. Pre-clinical development of a multi-CTL epitope-based DNA prime MVA boost vaccine for AIDS. *Immunol Lett*. 1999 Mar;66(1-3):177-81.

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.

Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 1997 Jul 15;159(2):635-43.

Henke A. DNA immunization--a new chance in vaccine research? *Med Microbiol Immunol*. 2002 Dec;191(3-4):187-90.

Hermanson G, Whitlow V, Parker S, Tonsky K, Rusalov D, Ferrari M, et al. A cationic lipid-formulated plasmid DNA vaccine confers sustained antibody-mediated protection against aerosolized anthrax spores. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Sep 14;101(37):13601-6.

Hess J, Kaufmann SH. Development of live recombinant vaccine candidates against tuberculosis. *Scand J Infect Dis*. 2001;33(10):723-4.

Hesseling AC, Rabie H, Marais BJ, Manders M, Lips M, Schaaf HS, et al. Bacille Calmette-Guerin vaccine-induced disease in HIV-infected and HIV-uninfected children. *Clin Infect Dis*. 2006 Feb 15;42(4):548-58.

Higgins DM, Sanchez-Campillo J, Rosas-Taraco AG, Lee EJ, Orme IM, Gonzalez-Juarrero M. Lack of IL-10 alters inflammatory and immune responses during pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis (Edinb)*. 2009 Mar;89(2):149-57.

Hoft DF. Tuberculosis vaccine development: goals, immunological design, and evaluation. *Lancet*. 2008 Jul 12;372(9633):164-75.

Hoft DF, Blazevic A, Abate G, Hanekom WA, Kaplan G, Soler JH, et al. A new recombinant bacille Calmette-Guerin vaccine safely induces significantly enhanced tuberculosis-specific immunity in human volunteers. *J Infect Dis*. 2008 Nov 15;198(10):1491-501.

Horn C. APA glycoproteins of *M.tuberculosis* elicited differential T cell responses in TB patients and healthy donors. XXVII Meeting of the Brazilian Society of Immunology; Salvador-BA2002.

Horn C, Namane A, Pescher P, Riviere M, Romain F, Puzo G, et al. Decreased capacity of recombinant 45/47-kDa molecules (Apa) of *Mycobacterium tuberculosis* to stimulate T lymphocyte responses related to changes in their mannosylation pattern. *J Biol Chem*. 1999 Nov 5;274(45):32023-30.

Horwitz MA. Recombinant BCG expressing *Mycobacterium tuberculosis* major extracellular proteins. *Microbes Infect*. 2005 May;7(5-6):947-54.

Horwitz MA, Harth G. A new vaccine against tuberculosis affords greater survival after challenge than the current vaccine in the guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Infect Immun*. 2003 Apr;71(4):1672-9.

Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Maslesa-Galic S. A novel live recombinant mycobacterial vaccine against bovine tuberculosis more potent than BCG. *Vaccine*. 2006 Mar 6;24(10):1593-600.

Horwitz MA, Lee BW, Dillon BJ, Harth G. Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Feb 28;92(5):1530-4.

Hussey G, Hawkrigde T, Hanekom W. Childhood tuberculosis: old and new vaccines. *Paediatr Respir Rev*. 2007 Jun;8(2):148-54.

Izzo A, Brandt L, Lasco T, Kipnis AP, Orme I. NIH pre-clinical screening program: overview and current status. *Tuberculosis (Edinb)*. 2005 Jan-Mar;85(1-2):25-8.

Jackson M, Raynaud C, Laneelle MA, Guilhot C, Laurent-Winter C, Ensergueix D, et al. Inactivation of the antigen 85C gene profoundly affects the mycolate content and alters the permeability of the *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. *Mol Microbiol*. 1999 Mar;31(5):1573-87.

Jain R, Dey B, Dhar N, Rao V, Singh R, Gupta UD, et al. Enhanced and enduring protection against tuberculosis by recombinant BCG-Ag85C and its association with modulation of cytokine profile in lung. *PLoS One*. 2008;3(12):e3869.

Jiang S, Zhu DY, Luo XD, Jiang Y, Chen Q. [Therapeutic effects of DNA vaccines in a murine model of *Mycobacterium tuberculosis* infection]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2005 May;28(5):305-9.

Johansen P, Raynaud C, Yang M, Colston MJ, Tascon RE, Lowrie DB. Anti-mycobacterial immunity induced by a single injection of *M. leprae* Hsp65-encoding plasmid DNA in biodegradable microparticles. *Immunol Lett*. 2003 Dec 15;90(2-3):81-5.

Johnson CM, Cooper AM, Frank AA, Bonorino CB, Wysoki LJ, Orme IM. *Mycobacterium tuberculosis* aerogenic rechallenge infections in B cell-deficient mice. *Tuber Lung Dis*. 1997;78(5-6):257-61.

Jung YJ, Ryan L, LaCourse R, North RJ. Increased interleukin-10 expression is not responsible for failure of T helper 1 immunity to resolve airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Immunology*. 2003 Jun;109(2):295-9.

Kamath AT, Feng CG, Macdonald M, Briscoe H, Britton WJ. Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1999 Apr;67(4):1702-7.

Kaplan G, Post FA, Moreira AL, Wainwright H, Kreiswirth BN, Tanverdi M, et al. *Mycobacterium tuberculosis* growth at the cavity surface: a microenvironment with failed immunity. *Infect Immun*. 2003 Dec;71(12):7099-108.

Karpelowsky JS, Alexander AG, Peek SD, Millar AJ, Rode H. Surgical complications of bacille Calmette-Guerin (BCG) infection in HIV-infected children: time for a change in policy. *S Afr Med J*. 2008 Oct;98(10):801-4.

Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol*. 2001 Oct;1(1):20-30.

Kaufmann SH. Future vaccination strategies against tuberculosis: thinking outside the box. *Immunity*. 2010 Oct 29;33(4):567-77.

Kaufmann SH, Hussey G, Lambert PH. New vaccines for tuberculosis. *Lancet*. 2010 Jun 12;375(9731):2110-9.

Kaufmann SH, McMichael AJ. Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nat Med*. 2005 Apr;11(4 Suppl):S33-44.

Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nat Immunol*. 2007 Apr;8(4):369-77.

Khader SA, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine*. 2008 Feb;41(2):79-83.

Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piguet PF, Vassalli P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell*. 1989 Mar 10;56(5):731-40.

Kirman JR, Turon T, Su H, Li A, Kraus C, Polo JM, et al. Enhanced immunogenicity to Mycobacterium tuberculosis by vaccination with an alphavirus plasmid replicon expressing antigen 85A. *Infect Immun*. 2003 Jan;71(1):575-9.

Kobayashi H, Yamada T, Eishi Y, Yamamoto K, Mitarai T. [Correlation among infection, immunity, and hypersensitivity: discussion]. *Nippon Naika Gakkai Zasshi*. 2001 Dec 10;90(12):2443-58.

Koike K, Kobayashi M, Gondo M, Hayashi I, Osuga T, Takada S. Hepatitis B virus DNA is frequently found in liver biopsy samples from hepatitis C virus-infected chronic hepatitis patients. *J Med Virol*. 1998 Apr;54(4):249-55.

Kumar P, Amara RR, Challu VK, Chadda VK, Satchidanandam V. The Apa protein of Mycobacterium tuberculosis stimulates gamma interferon-secreting CD4+ and CD8+ T cells from purified protein derivative-positive individuals and affords protection in a guinea pig model. *Infect Immun*. 2003 Apr;71(4):1929-37.

Ladel CH, Blum C, Dreher A, Reifenberg K, Kopf M, Kaufmann SH. Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice. *Infect Immun*. 1997 Nov;65(11):4843-9.

Lancioni CL, Li Q, Thomas JJ, Ding X, Thiel B, Drage MG, et al. Mycobacterium tuberculosis lipoproteins directly regulate human memory CD4(+) T cell activation via Toll-like receptors 1 and 2. *Infect Immun*. 2011 Feb;79(2):663-73.

Laqueyrie A, Militzer P, Romain F, Eiglmeier K, Cole S, Marchal G. Cloning, sequencing, and expression of the apa gene coding for the Mycobacterium tuberculosis 45/47-kilodalton secreted antigen complex. *Infect Immun*. 1995 Oct;63(10):4003-10.

Ledwith BJ, Manam S, Troilo PJ, Barnum AB, Pauley CJ, Griffiths TG, 2nd, et al. Plasmid DNA vaccines: assay for integration into host genomic DNA. *Dev Biol (Basel)*. 2000;104:33-43.

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*. 1998 May 18;187(10):1633-40.

Lima KM, dos Santos SA, Rodrigues JM, Jr., Silva CL. Vaccine adjuvant: it makes the difference. *Vaccine*. 2004 Jun 23;22(19):2374-9.

Lima KM, Santos SA, Lima VM, Coelho-Castelo AA, Rodrigues JM, Jr., Silva CL. Single dose of a vaccine based on DNA encoding mycobacterial hsp65 protein plus TDM-loaded PLGA microspheres protects mice against a virulent strain of Mycobacterium tuberculosis. *Gene Ther*. 2003 Apr;10(8):678-85.

Lima VM, Bonato VL, Lima KM, Dos Santos SA, Dos Santos RR, Goncalves ED, et al. Role of trehalose dimycolate in recruitment of cells and modulation of production of cytokines and NO in tuberculosis. *Infect Immun*. 2001 Sep;69(9):5305-12.

Lin MY, Ottenhoff TH. Not to wake a sleeping giant: new insights into host-pathogen interactions identify new targets for vaccination against latent Mycobacterium tuberculosis infection. *Biol Chem*. 2008 May;389(5):497-511.

Lingnau K, Riedl K, von Gabain A. IC31 and IC30, novel types of vaccine adjuvant based on peptide delivery systems. *Expert Rev Vaccines*. 2007 Oct;6(5):741-6.

Liu J, Ewald BA, Lynch DM, Denholtz M, Abbink P, Lemckert AA, et al. Magnitude and phenotype of cellular immune responses elicited by recombinant adenovirus vectors and heterologous prime-boost regimens in rhesus monkeys. *J Virol*. 2008 May;82(10):4844-52.

Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, et al. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med*. 1998 Feb 16;187(4):601-8.

Lu D, Garcia-Contreras L, Muttill P, Padilla D, Xu D, Liu J, et al. Pulmonary immunization using antigen 85-B polymeric microparticles to boost tuberculosis immunity. *AAPS J*. 2010.

Maher D, Dye C, Floyd K, Pantoja A, Lonroth K, Reid A, et al. Planning to improve global health: the next decade of tuberculosis control. *Bull World Health Organ.* 2007 May;85(5):341-7.

Majlessi L, Simsova M, Jarvis Z, Brodin P, Rojas MJ, Bauche C, et al. An increase in antimycobacterial Th1-cell responses by prime-boost protocols of immunization does not enhance protection against tuberculosis. *Infect Immun.* 2006 Apr;74(4):2128-37.

Majumder N, Bhattacharjee S, Bhattacharyya Majumdar S, Dey R, Guha P, Pal NK, et al. Restoration of impaired free radical generation and proinflammatory cytokines by MCP-1 in mycobacterial pathogenesis. *Scand J Immunol.* 2008 Apr;67(4):329-39.

Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol.* 2001 Sep;2(9):816-22.

Martin C. The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG? *Eur Respir J.* 2005 Jul;26(1):162-7.

McShane H, Hill A. Prime-boost immunisation strategies for tuberculosis. *Microbes Infect.* 2005 May;7(5-6):962-7.

McShane H, Pathan AA, Sander CR, Goonetilleke NP, Fletcher HA, Hill AV. Boosting BCG with MVA85A: the first candidate subunit vaccine for tuberculosis in clinical trials. *Tuberculosis (Edinb).* 2005 Jan-Mar;85(1-2):47-52.

McShane H, Pathan AA, Sander CR, Keating SM, Gilbert SC, Huygen K, et al. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat Med.* 2004 Nov;10(11):1240-4.

Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Departamento de vigilância epidemiológica. 2010.

Mitsuyama M, Akagawa K, Kobayashi K, Sugawara I, Kawakami K, Yamamoto S, et al. [Up-to-date understanding of tuberculosis immunity]. *Kekkaku.* 2003 Jan;78(1):51-5.

Mohan VP, Scanga CA, Yu K, Scott HM, Tanaka KE, Tsang E, et al. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infect Immun.* 2001 Mar;69(3):1847-55.

Moreira AL, Tsenova-Berkova L, Wang J, Laochumroonvorapong P, Freeman S, Freedman VH, et al. Effect of cytokine modulation by thalidomide on the granulomatous response in murine tuberculosis. *Tuber Lung Dis.* 1997;78(1):47-55.

Murphy D, Corner LA, Gormley E. Adverse reactions to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccination against tuberculosis in humans, veterinary animals and wildlife species. *Tuberculosis (Edinb).* 2008 Jul;88(4):344-57.

Murray PJ, Wang L, Onufryk C, Tepper RI, Young RA. T cell-derived IL-10 antagonizes macrophage function in mycobacterial infection. *J Immunol*. 1997 Jan 1;158(1):315-21.

Nicod LP. Immunology of tuberculosis. *Swiss Med Wkly*. 2007 Jun 30;137(25-26):357-62.

Noll H. The chemistry of cord factor, a toxic glycolipid of *M. tuberculosis*. *Bibl Tuberc*. 1956(10):149-83.

Orme IM. Characteristics and specificity of acquired immunologic memory to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*. 1988 May 15;140(10):3589-93.

Orme IM. The use of animal models to guide rational vaccine design. *Microbes Infect*. 2005 May;7(5-6):905-10.

Orme IM, Andersen P, Boom WH. T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. 1993 Jun;167(6):1481-97.

Orme IM, McMurray DN, Belisle JT. Tuberculosis vaccine development: recent progress. *Trends Microbiol*. 2001 Mar;9(3):115-8.

Otten GR, Schaefer M, Doe B, Liu H, Srivastava I, Megede J, et al. Enhanced potency of plasmid DNA microparticle human immunodeficiency virus vaccines in rhesus macaques by using a priming-boosting regimen with recombinant proteins. *J Virol*. 2005 Jul;79(13):8189-200.

Ottenhoff TH, Kumararatne D, Casanova JL. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-I cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Immunol Today*. 1998 Nov;19(11):491-4.

Pal PG, Horwitz MA. Immunization with extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis* induces cell-mediated immune responses and substantial protective immunity in a guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Infect Immun*. 1992 Nov;60(11):4781-92.

Paula MO, Wowk PF, Fonseca DM, Gembre AF, Silva CL, Bonato VLD, editors. Regulatory T cells may represent a susceptibility-related factor in experimental tuberculosis. *Keystone Symposium for Tuberculosis: Biology, Pathology and Therapy*; 2009.

Pelizon AC, Martins DR, Zorzella-Pezavento SF, Seger J, Justulin LA, Jr., da Fonseca DM, et al. Neonatal BCG immunization followed by DNAhsp65 boosters: highly immunogenic but not protective against tuberculosis - a paradoxical effect of the vector? *Scand J Immunol*. 2010 Feb;71(2):63-9.

Perez RL, Roman J, Staton GW, Jr., Hunter RL. Extravascular coagulation and fibrinolysis in murine lung inflammation induced by the mycobacterial cord factor trehalose-6,6'-dimycolate. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994 Feb;149(2 Pt 1):510-8.

Pugin J, Heumann ID, Tomasz A, Kravchenko VV, Akamatsu Y, Nishijima M, et al. CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity.* 1994 Sep;1(6):509-16.

Radosevic K, Wieland CW, Rodriguez A, Weverling GJ, Mintardjo R, Gillissen G, 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 gamma interferon. *Infect Immun.* 2007 Aug;75(8):4105-15.

Raja A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res.* 2004 Oct;120(4):213-32.

Randhawa PS. Lymphocyte subsets in granulomas of human tuberculosis: an in situ immunofluorescence study using monoclonal antibodies. *Pathology.* 1990 Jul;22(3):153-5.

Reece ST, Kaufmann SH. Rational design of vaccines against tuberculosis directed by basic immunology. *Int J Med Microbiol.* 2008 Jan;298(1-2):143-50.

Reed SG, Coler RN, Dalemans W, Tan EV, DeLa Cruz EC, Basaraba RJ, et al. Defined tuberculosis vaccine, Mtb72F/AS02A, evidence of protection in cynomolgus monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Feb 17;106(7):2301-6.

Ribeiro-Rodrigues R, Resende Co T, Rojas R, Toossi Z, Dietze R, Boom WH, et al. A role for CD4+CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. *Clin Exp Immunol.* 2006 Apr;144(1):25-34.

Roberts AD, Sonnenberg MG, Ordway DJ, Furney SK, Brennan PJ, Belisle JT, et al. Characteristics of protective immunity engendered by vaccination of mice with purified culture filtrate protein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology.* 1995 Jul;85(3):502-8.

Rodrigues JML, K. M.; Castelo, A., A. M.; MARTINS LDBS, S. A. S.; FACCIOLI, L. H.; SILVA CL. É possível uma vacina gênica auxiliar no controle da tuberculose? *Jornal Brasileiro de Pneumologia.* 2004(30):468-77.

Rodrigues LC, Pereira SM, Cunha SS, Genser B, Ichihara MY, de Brito SC, et al. Effect of BCG revaccination on incidence of tuberculosis in school-aged children in Brazil: the BCG-REVAC cluster-randomised trial. *Lancet.* 2005 Oct 8;366(9493):1290-5.

Rojas M, Olivier M, Gros P, Barrera LF, Garcia LF. TNF-alpha and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. *J Immunol.* 1999 May 15;162(10):6122-31.

Romain F, Horn C, Pescher P, Namane A, Riviere M, Puzo G, et al. Deglycosylation of the 45/47-kilodalton antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis* decreases its capacity to elicit in vivo or in vitro cellular immune responses. *Infect Immun*. 1999 Nov;67(11):5567-72.

Romain F, Laqueyrie A, Militzer P, Pescher P, Chavarot P, Lagranderie M, et al. Identification of a *Mycobacterium bovis* BCG 45/47-kilodalton antigen complex, an immunodominant target for antibody response after immunization with living bacteria. *Infect Immun*. 1993 Feb;61(2):742-50.

Rook GA. Th2 cytokines in susceptibility to tuberculosis. *Curr Mol Med*. 2007 May;7(3):327-37.

Rook GA, Dheda K, Zumla A. Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. *Nat Rev Immunol*. 2005 Aug;5(8):661-7.

Rook GA, Stanford JL. The Koch phenomenon and the immunopathology of tuberculosis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996;215:239-62.

Rooney JF, Wohlenberg C, Cremer KJ, Moss B, Notkins AL. Immunization with a vaccinia virus recombinant expressing herpes simplex virus type 1 glycoprotein D: long-term protection and effect of revaccination. *J Virol*. 1988 May;62(5):1530-4.

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

Rouanet C, Locht C. Boosting BCG to protect against TB. *Expert Rev Respir Med*. 2010 Jun;4(3):339-48.

Ruffino-Netto A. [Tuberculosis: the neglected calamity]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002 Jan-Feb;35(1):51-8.

Russell DG. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol*. 2007 Jan;5(1):39-47.

Russell DG, Cardona PJ, Kim MJ, Allain S, Altare F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol*. 2009 Sep;10(9):943-8.

Rutledge BJ, Rayburn H, Rosenberg R, North RJ, Gladue RP, Corless CL, et al. High level monocyte chemoattractant protein-1 expression in transgenic mice increases their susceptibility to intracellular pathogens. *J Immunol*. 1995 Nov 15;155(10):4838-43.

Sable SB, Cheruvu M, Nandakumar S, et al. Cellular Immune Responses to Nine *Mycobacterium tuberculosis* Vaccine Candidates following Intranasal Vaccination. *PLoS One*. 2011;6(7):e22718.

Sadoff JC. Vaccine risk and benefit in the developing world. *Health Aff (Millwood)*. 2005 Sep-Oct;24(5):1379-80.

Saito R, Tanaka A, Sugiyama K, Azuma I, Yamamura Y. Adjuvant effect of cord factor, a mycobacterial lipid. *Infect Immun*. 1976 Mar;13(3):776-81.

Sali M, Clarizio S, Pusceddu C, Zumbo A, Pecorini G, Rocca S, et al. Evaluation of the anti-tuberculosis activity generated by different multigene DNA vaccine constructs. *Microbes Infect*. 2008 May;10(6):605-12.

Sallusto F, Lanzavecchia A. Human Th17 cells in infection and autoimmunity. *Microbes Infect*. 2009 Apr;11(5):620-4.

Sander CR, Pathan AA, Beveridge NE, Poulton I, Minassian A, Alder N, et al. Safety and immunogenicity of a new tuberculosis vaccine, MVA85A, in Mycobacterium tuberculosis-infected individuals. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Apr 15;179(8):724-33.

Sarhan MA. Tuberculosis vaccine. *Saudi Med J*. 2010 Jan;31(1):9-13.

Saunders BM, Frank AA, Orme IM, Cooper AM. Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to Mycobacterium tuberculosis infection. *Infect Immun*. 2000 Jun;68(6):3322-6.

Scanga CA, Mohan VP, Yu K, Joseph H, Tanaka K, Chan J, et al. Depletion of CD4(+) T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon gamma and nitric oxide synthase 2. *J Exp Med*. 2000 Aug 7;192(3):347-58.

Schalk JA, Mooi FR, Berbers GA, van Aerts LA, Ovelgonne H, Kimman TG. Preclinical and clinical safety studies on DNA vaccines. *Hum Vaccin*. 2006 Mar-Apr;2(2):45-53.

Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*. 1990 Jan 1;75(1):40-7.

Schluger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Mar;157(3 Pt 1):679-91.

Scott-Browne JP, Shafiani S, Tucker-Heard G, Ishida-Tsubota K, Fontenot JD, Rudensky AY, et al. Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *J Exp Med*. 2007 Sep 3;204(9):2159-69.

Scriba TJ, Tameris M, Mansoor N, Smit E, van der Merwe L, Isaacs F, 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 Jan;40(1):279-90.

Seder RA, Ahmed R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol*. 2003 Sep;4(9):835-42.

Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol*. 2008 Apr;8(4):247-58.

Serbina NV, Liu CC, Scanga CA, Flynn JL. CD8+ CTL from lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice express perforin in vivo and lyse infected macrophages. *J Immunol*. 2000 Jul 1;165(1):353-63.

Sheil B, MacSharry J, O'Callaghan L, O'Riordan A, Waters A, Morgan J, et al. Role of interleukin (IL-10) in probiotic-mediated immune modulation: an assessment in wild-type and IL-10 knock-out mice. *Clin Exp Immunol*. 2006 May;144(2):273-80.

Shi S, Hickey AJ. PLGA microparticles in respirable sizes enhance an in vitro T cell response to recombinant *Mycobacterium tuberculosis* antigen TB10.4-Ag85B. *Pharm Res*. 2010 Feb;27(2):350-60.

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

Skeiky YA, Alderson MR, Ovendale PJ, Guderian JA, Brandt L, Dillon DC, et al. Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. *J Immunol*. 2004 Jun 15;172(12):7618-28.

Skeiky YA, Lodes MJ, Guderian JA, Mohamath R, Bement T, Alderson MR, et al. Cloning, expression, and immunological evaluation of two putative secreted serine protease antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1999 Aug;67(8):3998-4007.

Skeiky YA, Sadoff JC. Advances in tuberculosis vaccine strategies. *Nat Rev Microbiol*. 2006 Jun;4(6):469-76.

Skinner MA, Buddle BM, Wedlock DN, Keen D, de Lisle GW, Tascon RE, et al. A DNA prime-*Mycobacterium bovis* BCG boost vaccination strategy for cattle induces protection against bovine tuberculosis. *Infect Immun*. 2003 Sep;71(9):4901-7.

Skinner MA, Keen DL, Parlane NA, Hamel KL, Yates GF, Buddle BM. Improving protective efficacy of BCG vaccination for wildlife against bovine tuberculosis. *Res Vet Sci*. 2005 Jun;78(3):231-6.

Soysal A, Millington KA, Bakir M, Dosanjh D, Aslan Y, Deeks JJ, et al. Effect of BCG vaccination on risk of *Mycobacterium tuberculosis* infection in children with

household tuberculosis contact: a prospective community-based study. *Lancet*. 2005 Oct 22-28;366(9495):1443-51.

Spargo BJ, Crowe LM, Ioneda T, Beaman BL, Crowe JH. Cord factor (alpha,alpha-trehalose 6,6'-dimycolate) inhibits fusion between phospholipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Feb 1;88(3):737-40.

Stanford J, Stanford C, Grange J. Immunotherapy with *Mycobacterium vaccae* in the treatment of tuberculosis. *Front Biosci*. 2004 May 1;9:1701-19.

StopTB Tuberculosis Vaccine Pipeline 2009 [database on the Internet]2009. Available from: http://www.stoptb.org/wg/new_vaccines/assets/documents/TB%20Vaccine%20Pipeline%202009.pdf.

Sun R, Skeiky YA, Izzo A, Dheenadhayalan V, Imam Z, Penn E, 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 Jul 16;27(33):4412-23.

Tang Q, Dou J, Zhao FS, Chu LL, Pan M, Wang YF. [Effect of the immune strategy based on BCG priming and Ag85A/GM-CSF DNA vaccine boosting in mice]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2007 Jul;23(7):591-4.

Tanghe A, Dangy JP, Pluschke G, Huygen K. Improved protective efficacy of a species-specific DNA vaccine encoding mycolyl-transferase Ag85A from *Mycobacterium ulcerans* by homologous protein boosting. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(3):e199.

Tanghe A, Lefevre P, Denis O, D'Souza S, Braibant M, Lozes E, et al. Immunogenicity and protective efficacy of tuberculosis DNA vaccines encoding putative phosphate transport receptors. *J Immunol*. 1999 Jan 15;162(2):1113-9.

Taylor JL, Turner OC, Basaraba RJ, Belisle JT, Huygen K, Orme IM. Pulmonary necrosis resulting from DNA vaccination against tuberculosis. *Infect Immun*. 2003 Apr;71(4):2192-8.

Tchilian EZ, Desel C, Forbes EK, Bandermann S, Sander CR, Hill AV, et al. Immunogenicity and protective efficacy of prime-boost regimens with recombinant (delta)ureC hly+ *Mycobacterium bovis* BCG and modified vaccinia virus ankara expressing *M. tuberculosis* antigen 85A against murine tuberculosis. *Infect Immun*. 2009 Feb;77(2):622-31.

Tebianian M, Hoseini AZ, Ebrahimi SM, Memarnejadian A, Mokarram AR, Mahdavi M, et al. Cloning, expression, and immunogenicity of novel fusion protein of Mycobacterium tuberculosis based on ESAT-6 and truncated C-terminal fragment of HSP70. *Biologicals*. 2011 May;39(3):143-8.

Torchinsky MB, Garaude J, Martin AP, Blander JM. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation. *Nature*. 2009 Mar 5;458(7234):78-82.

Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity*. 2003 Nov;19(5):641-4.

Trinchieri G, Scott P. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions. *Res Immunol*. 1995 Sep-Oct;146(7-8):423-31.

Trunz BB, Fine P, Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet*. 2006 Apr 8;367(9517):1173-80.

Tsai MC, Chakravarty S, Zhu G, Xu J, Tanaka K, Koch C, et al. Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cell Microbiol*. 2006 Feb;8(2):218-32.

Turner J, Frank AA, Brooks JV, Gonzalez-Juarrero M, Orme IM. The progression of chronic tuberculosis in the mouse does not require the participation of B lymphocytes or interleukin-4. *Exp Gerontol*. 2001 Mar;36(3):537-45.

Turner J, Gonzalez-Juarrero M, Ellis DL, Basaraba RJ, Kipnis A, Orme IM, et al. In vivo IL-10 production reactivates chronic pulmonary tuberculosis in C57BL/6 mice. *J Immunol*. 2002 Dec 1;169(11):6343-51.

Turner OC, Basaraba RJ, Orme IM. Immunopathogenesis of pulmonary granulomas in the guinea pig after infection with Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun*. 2003 Feb;71(2):864-71.

Ulmer JB, Liu MA, Montgomery DL, Yawman AM, Deck RR, DeWitt CM, et al. Expression and immunogenicity of Mycobacterium tuberculosis antigen 85 by DNA vaccination. *Vaccine*. 1997 Jun;15(8):792-4.

Ulmer JB, Wahren B, Liu MA. DNA vaccines: recent technological and clinical advances. *Discov Med*. 2006 Jun;6(33):109-12.

Ulrichs T, Kaufmann SH. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol*. 2006 Jan;208(2):261-9.

Ulrichs T, Kosmiadi GA, Trusov V, Jorg S, Pradl L, Titukhina M, et al. Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. *J Pathol*. 2004 Oct;204(2):217-28.

Usui T, Preiss JC, Kanno Y, Yao ZJ, Bream JH, O'Shea JJ, et al. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *J Exp Med*. 2006 Mar 20;203(3):755-66.

van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Apr;15(2):294-309.

van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, et al. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell*. 2007 Jun 29;129(7):1287-98.

van Dissel JT, Soonawala D, Joosten SA, Prins C, Arend SM, Bang P, et al. Ag85B-ESAT-6 adjuvanted with IC31((R)) promotes strong and long-lived *Mycobacterium tuberculosis* specific T cell responses in volunteers with previous BCG vaccination or tuberculosis infection. *Vaccine*. 2011 Mar 3;29(11):2100-9.

Verreck FA, Vervenne RA, Kondova I, van Kralingen KW, Remarque EJ, Braskamp G, et al. MVA.85A 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.

Vilaplana C, Montane E, Pinto S, Barriocanal AM, Domenech G, Torres F, et al. Double-blind, randomized, placebo-controlled Phase I Clinical Trial of the therapeutical antituberculous vaccine RUTI. *Vaccine*. 2010 Jan 22;28(4):1106-16.

Von Eschen K, Morrison R, Braun M, Ofori-Anyinam O, De Kock E, Pavithran P, et al. The candidate tuberculosis vaccine Mtb72F/AS02A: Tolerability and immunogenicity in humans. *Hum Vaccin*. 2009 Jul;5(7):475-82.

Von Reyn C. The DarDar prime-boost TB vaccine trial in HIV infection: final results. 39th World Conference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; Paris: International Journal of Tuberculosis and Lung Disease; 200.

Vordermeier HM, Villarreal-Ramos B, Cockle PJ, McAulay M, Rhodes SG, Thacker T, et al. Viral booster vaccines improve *Mycobacterium bovis* BCG-induced protection against bovine tuberculosis. *Infect Immun*. 2009 Aug;77(8):3364-73.

Voskuil MI, Schnappinger D, Visconti KC, Harrell MI, Dolganov GM, Sherman DR, et al. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. *J Exp Med*. 2003 Sep 1;198(5):705-13.

Wang C, Chen Z, Fu R, Zhang Y, Chen L, Huang L, et al. A DNA vaccine expressing CFP21 and MPT64 fusion protein enhances BCG-induced protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Med Microbiol Immunol*. 2011 Feb 22.

Wang D, Robinson DR, Kwon GS, Samuel J. Encapsulation of plasmid DNA in biodegradable poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres as a novel approach for immunogene delivery. *J Control Release*. 1999 Jan 4;57(1):9-18.

Wang J, Qie Y, Zhu B. Evaluation of a recombinant BCG expressing antigen AG85B and PPE protein Rv3425 from DNA segment RD11 of *Mycobacterium tuberculosis* in C57BL/c mice. *Med Microbiol Immunol*. 2009.

Wang J, Wakeham J, Harkness R, Xing Z. Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. *J Clin Invest*. 1999 Apr;103(7):1023-9.

Wang J, Xing Z. Tuberculosis vaccines: the past, present and future. *Expert Rev Vaccines*. 2002 Oct;1(3):341-54.

Wang LM, Bai YL, Shi CH, Gao H, Xue Y, Jiang H, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a DNA vaccine encoding the fusion protein of mycobacterium heat shock protein 65 (Hsp65) with human interleukin-2 against *Mycobacterium tuberculosis* in BALB/c mice. *APMIS*. 2008 Dec;116(12):1071-81.

Weinrich Olsen A, van Pinxteren LA, Meng Okkels L, Birk Rasmussen P, Andersen P. Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85b and esat-6. *Infect Immun*. 2001 May;69(5):2773-8.

Wherry EJ, Teichgraber V, Becker TC, Masopust D, Kaech SM, Antia R, et al. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol*. 2003 Mar;4(3):225-34.

Williams A, Goonetilleke NP, McShane H, Clark SO, Hatch G, Gilbert SC, et al. Boosting with poxviruses enhances *Mycobacterium bovis* BCG efficacy against tuberculosis in guinea pigs. *Infect Immun*. 2005 Jun;73(6):3814-6.

Williams A, Hatch GJ, Clark SO, Gooch KE, Hatch KA, Hall GA, et al. Evaluation of vaccines in the EU TB Vaccine Cluster using a guinea pig aerosol infection model of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2005 Jan-Mar;85(1-2):29-38.

Winau F, Hegasy G, Kaufmann SH, Schaible UE. No life without death--apoptosis as prerequisite for T cell activation. *Apoptosis*. 2005 Aug;10(4):707-15.

Winau F, Weber S, Sad S, de Diego J, Hoops SL, Breiden B, et al. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity*. 2006 Jan;24(1):105-17.

World Health Organization. Global Tuberculosis Control. Epidemiology, strategy, financing. 2005;Geneva : WHO.

World Health Organization. Global Tuberculosis Control. Epidemiology, strategy, financing. 2006;Geneva : WHO.

World Health Organization. Global Tuberculosis Control. Epidemiology, strategy, financing. 2010;Geneva : WHO.

Xu J, Xu W, Chen X, Zhao D, Wang Y. Recombinant DNA vaccine of the early secreted antigen ESAT-6 by Mycobacterium tuberculosis and Flt3 ligand enhanced the cell-mediated immunity in mice. *Vaccine*. 2008 Aug 18;26(35):4519-25.

Xu Y, Wang B, Chen J, Wang Q, Zhu B, Shen H, et al. Chimaeric protein improved immunogenicity compared with fusion protein of Ag85B and ESAT-6 antigens of Mycobacterium tuberculosis. *Scand J Immunol*. 2006 Nov;64(5):476-81.

Young D, Dye C. The development and impact of tuberculosis vaccines. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):683-7.

Zhang F, Nakamura T, Aune TM. TCR and IL-12 receptor signals cooperate to activate an individual response element in the IFN-gamma promoter in effector Th cells. *J Immunol*. 1999 Jul 15;163(2):728-35.